

Université de Montréal

**Un cas sévère d'ichthyose huileuse chez deux jumelles  
monozygotes diffère du syndrome de Chanarin-Dorfman et  
constitue une nouvelle entité nosologique**

Par

Crina Cristina Solomon

Département de Sciences Biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M.Sc)

En Sciences Biomédicales

Août, 2005

©Crina Cristina Solomon, 2005



W

4

U58

2006

V. 046

## **AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## **NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Un cas sévère d'ichthyose huileuse chez deux jumelles  
monozygotes diffère du syndrome de Chanarin-Dorfman et  
constitue une nouvelle entité nosologique**

présenté par :

Crina Cristina Solomon

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Émile Lévy  
Président rapporteur

Dr Jean Davignon  
Directeur de recherche

Dr Lise Bernier  
Codirecteur

Dr Dominique Friedmann  
Membre de jury

Mémoire accepté le : \_\_\_\_\_

## SOMMAIRE

Le syndrome de Chanarin-Dorfman est une maladie récessive autosomique rare du stockage des lipides. Des mutations du gène *CGI-58* sont responsables de cette maladie. Nos patientes satisfont plusieurs des critères du syndrome de Chanarin-Dorfman, mais elles diffèrent par les caractéristiques huileuses de l'ichtyose et par l'absence de mutation du gène *CGI-58*. L'**objectif** est d'élucider les mécanismes responsables des problèmes d'hypersecretion et d'hyperprolifération de l'épiderme. **Méthode** : Des biopsies cutanées de ces patientes ont été effectuées et des kératinocytes prélevés à partir de ces biopsies ont été cultivés en monocouche et à l'intérieur d'un modèle tridimensionnel de peau reconstruite *in vitro*. Nous avons mesuré par buvardage Northern et par PCR en temps réel l'expression de l'ARNm de plusieurs gènes. L'ADN génomique a été séquencé pour vérifier la présence de certaines mutations. **Résultat** : Les analyses histologiques des biopsies cutanées montrent une apparence anormale de la couche cornée. Les coupes histologiques de peau reconstruite montrent un processus de différenciation incomplet. Pendant la différenciation normale des kératinocytes, l'expression de plusieurs molécules varie. Les PPAR $\alpha$ , la kératine 10 et l'apoE augmentent alors que le récepteur LDL diminue. Nous avons démontré que le PPAR $\alpha$  n'augmente pas chez les patientes. La SCD1 catalyse la synthèse cellulaire des acides gras insaturés et par buvardage Northern nous avons trouvé une forte surexpression de cette enzyme. La séquence de la SCD1 n'a toutefois révélé aucune mutation. DGAT2, catalyse l'étape finale de la production et l'accumulation des triglycérides dans les tissus. Nous avons vérifié les niveaux d'expression de cette enzyme dans les kératinocytes et séquencé l'ADN. **Conclusion** : Nous avons trouvé un problème de prolifération et de différenciation de la peau chez les patientes atteintes d'ichtyose huileuse. Finalement, cette maladie ressemble au syndrome de Chanarin-Dorfman mais n'en est pas un, parce que le gène impliqué, *CGI-58*, n'est pas muté. Elle constitue donc une nouvelle entité nosologique. C'est un pseudo syndrome de Chanarin-Dorfman. **Mots clés**: différenciation cellulaire, kératinocytes, ichtyose, syndrome de Chanarin-Dorfman, lipides de la peau

## ABSTRACT

Chanarin-Dorfman syndrome is a rare autosomal recessive disease of lipid storage. Mutations in the gene *CGI-58* are responsible for this disease. Our patients satisfy many criteria for Chanarin-Dorfman syndrome, but differ by the oily character of the ichthyosis and by the absence of mutation in *CGI-58*. The **objective** is to elucidate the mechanisms responsible for the problems of hypersecretion and hyperproliferation of the epidermis. **Methods:** Keratinocytes obtained from skin biopsies of our patients were cultivated in monolayer and were also used to prepare *in vitro* three-dimensional reconstruction of the skin. The expression of various genes was studied by Northern blot and Q-PCR. Genomic DNA was sequenced for mutations. **Results:** An abnormal appearance of the stratum corneum was demonstrated by histological analysis of skin biopsies. Histological analysis of reconstructed skin showed evidence of an incomplete differentiation process. During normal differentiation keratinocytes express many various proteins. PPAR $\alpha$ , keratin 10 and apoE mRNA increase while the LDL receptor mRNA decreases. We have demonstrated that the expression of PPAR $\alpha$  mRNA does not increase in our patients. We have found an overexpression of SCD1, the enzyme which catalyses intracellular synthesis of unsaturated fatty acids. Sequencing of SCD1 did not reveal the presence of any mutation. We also measured the expression of DGAT2, the enzyme that catalyses the final step in the production and accumulation of triglycerides in tissues. No mutations were found after sequencing of this enzyme. **Conclusion:** We found a problem of proliferation and differentiation of the skin in the patients suffering from oily ichthyosis. Although this disease resembles Chanarin-Dorfman syndrome, it is different since *CGI-58*, the gene responsible for Chanarin-Dorfman, is not mutated. Oily ichthyosis could therefore be considered a form of pseudo Chanarin-Dorfman syndrome, and a new nosological entity.

**Key words:** Cellular differentiation, keratinocytes, ichthyose, Chanarin-Dorfman syndrome, skin lipids

## TABLES DES MATIERES

<b>SOMMAIRE.....</b>	<b>I</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>x</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
 <b>1. Structure et fonctions de la peau.....</b>	 <b>1</b>
1.1 L'épiderme.....	2
1.2 Les couches épidermiques.....	4
1.2.1 La couche basale ou <i>stratum germinativum</i> .....	4
1.2.2 La couche épineuse ou <i>stratum spinosum</i> .....	5
1.2.3 La couche granuleuse ou <i>stratum granulosum</i> .....	6
1.2.4 La couche cornée ou <i>stratum corneum</i> .....	7
1.3 La jonction dermo-épidermique.....	8
1.4 Le derme.....	8
1.5 L'hypoderme.....	9
1.6 Les annexes cutanées.....	9
 <b>2. Ultrastructures épidermiques.....</b>	 <b>11</b>
2.1 Assemblage des kératinocytes.....	11
2.2 Expression des kératines lors de la différenciation cellulaire.....	14

<b>3. Structures et fonction des lipides épidermiques.....</b>	<b>15</b>
3.1 Origine des lipides cutanés de surface.....	16
3.2 Les lipides épidermiques.....	17
3.3 Les lipides des glandes sébacées.....	17
3.4 Mécanisme de synthèse des lipides cutanés de surface.....	19
3.5 Les acides gras libres.....	21
3.6 Les triglycérides.....	21
3.7 Le squalene.....	22
3.8 Autres rôles des lipides épidermiques : rétention de l'eau cutanée et contrôle de la desquamation .....	22
<b>4. Pathophysiologie de la peau .....</b>	<b>23</b>
4.1 Les ichthyoses.....	23
4.2 Le syndrome de Chanarin-Dorfman.....	26
<b>DESCRIPTION DU PROJET DE RECHERCHE.....</b>	<b>29</b>
<b>5. MATÉRIELS ET MÉTHODE.....</b>	<b>30</b>
5.1 Biopsies.....	30
5.2 Culture cellulaire .....	30
5.3 Préparation et culture des peaux reconstruites .....	31
5.4 Analyse histologique des peaux reconstruites.....	31
5.5 Immunofluorescence.....	32
5.6 Extraction de l'ADN génomique et amplification des exons pour séquençage.....	33
5.7 Séquençage.....	35
5.8 Extraction d'ARN et Transcription Inverse.....	35
5.9 Q-PCR.....	36
5.10 Extraction et analyse des lipides de la peau.....	37



<b>6. RÉSULTATS.....</b>	<b>38</b>
6.1 Analyse de biopsies cutanées et des peaux reconstituées.....	38
6.2 Analyse histologique des peaux reconstruites.....	40
6.3 Analyse de marqueurs de différenciation chez les kératinocytes en culture primaire.....	43
6.4 Expression de la kératine 10.....	45
6.5 Expression du LDL-R, de l'apoE et de l'apoC1.....	46
6.6 L'expression de CGI-58.....	49
6.7 Expression des PPARs.....	50
6.8 Séquençage de la kératine 10, la transglutaminase-1 et de la CGI-58.....	53
6.9 Expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides de la peau.....	53
6.10 Mélanocortine.....	58
 <b>DISCUSSION.....</b>	 <b>59</b>
 <b>CONCLUSION.....</b>	 <b>66</b>
 <b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	 <b>68</b>
 <b>REMERCIEMENTS.....</b>	 <b>xiii</b>

## LISTE DES TABLEAUX

- Tableau I Les principaux composants des lipides cutanés de surface chez l'homme
- Tableau II Le syndrome de Chanarin-Dorfman : comparaison avec l'ichtyose huileuse
- Tableau III Anticorps utilisés
- Tableau IV Séquences des amorces utilisées pour l'amplification de tous les exons de gènes spécifiques et du promoteur de SCD-1
- Tableau V Séquence des oligonucleotides utilisés pour l'amplification des gènes analysés par PCR quantitatif
- Tableau VI Bilan lipidique plasmatique
- Tableau VII Variation en quantité et en composition des lipides cutanés

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1    Structure de la peau
- Figure 2    Les couches épidermiques
- Figure 3    Les annexes cutanées
- Figure 4    Expression de différentes protéines dans les couches de la peau
- Figure 5    Étapes de la biosynthèse du squalène et du cholestérol
- Figure 6    Étapes de la biosynthèse des acides gras, des alcools gras, des cires estérifiées, des stérols estérifiés et des triglycérides
- Figure 7    Immunomarquage de la kératine 10
- Figure 8    Immunomarquage de la filaggrine
- Figure 9    Aspect macroscopique des peaux reconstruites à partir des kératinocytes de nouveau-né et à partir des kératinocytes de JB
- Figure 10   Coupes histologiques des peaux reconstruites à partir de kératinocytes d'un contrôle
- Figure 11   Coupes histologiques des peaux reconstruites chez JB

Figure 12 Expression de l'ARNm de la K10

Figure 13 Expression de l'ARNm du récepteur LDL

Figure 14 Expression de l'ARNm de l'apoE

Figure 15 Expression de l'ARNm de l'apoC1

Figure 16 Expression de l'ARNm de CGI-58

Figure 17 Expression de l'ARNm de PPAR $\alpha$

Figure 18 Expression de l'ARNm de PPAR $\beta$

Figure 19 Analyse des lipides de la peau faite par HPLC

Figure 20 Northern blot de l'ARN de SCD-1

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

K1 : kératine 1

NADP : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NADPH2 : Methylene-tetrahydrofolate Reductase

ECIS : Erythrodermie congénitale ichtyosiforme sèche

TGM1 : transglutaminase 1

IL2 : ichtyose lamellaire de type 2

ABCA12: ATP-binding cassette subfamily A proteins

NCIE2 : non bulleuses congénitale ichtyosiform erythroderma

KRT1 : kératine 1

SC-D : le syndrome de Chanarin-Dorfman

SNC : système nerveux centrale

$\Delta$  : delta

CGI-58 : comparative gene identification 58

LOEX: laboratories d'organogénèse expérimentale

OCT: Optimal Cutting Temperature

SCD-1: stéaroyl CoA desaturase

DGAT2: diacylglycerol acyl-transferase 2

ApoC1: apolipoprotéine C1

ApoE: apolipoprotéine E

LDL-R: low-density lipoprotein receptor

PPARs: peroxisome proliferators-activated receptors

TGK: transglutaminase

FFA: fraction acid gras

TG: triglycerides

PL: phospholipide

MC-5: melanocortin-5

MR-5: recepteur melanocortin -5

MSH: melanin-stimulant hormone

LOR: loricrin

FALDH: fatty aldehyde dehydrogenase

Elovl3: elongation of very long chain fatty acids like 3

B1: patiente LB

B2: patiente JB

*À mes parents...*

# INTRODUCTION

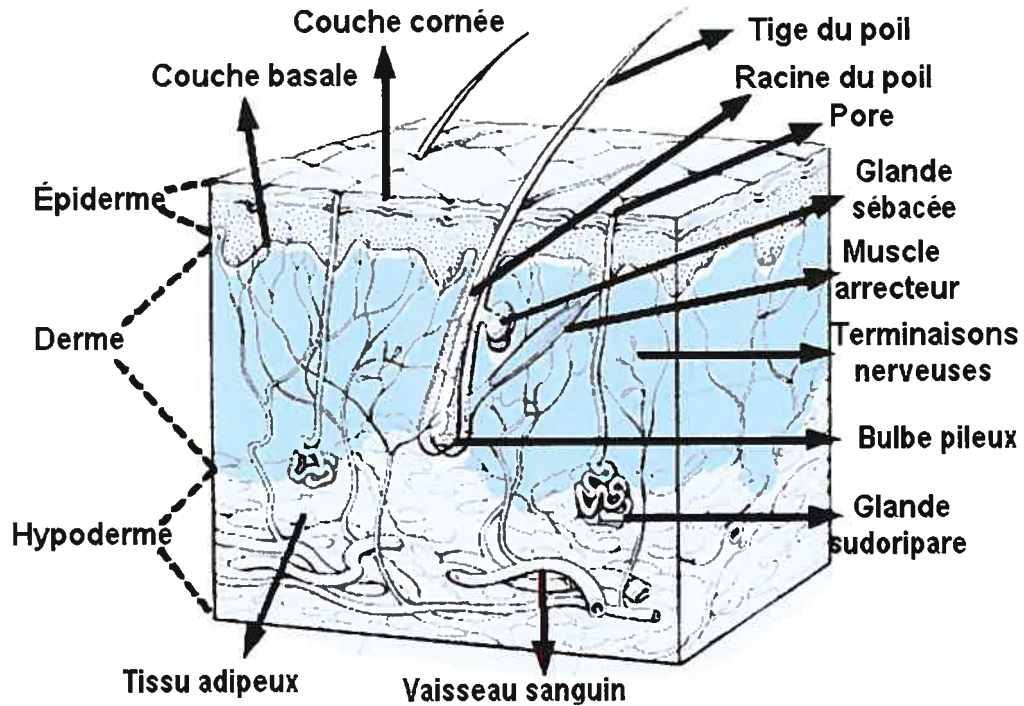
## 1. Structure et Fonctions de la peau

La peau est le plus grand organe de l'être humain. Elle est composée de deux couches interdépendantes : la plus externe constitue l'épiderme et la plus interne le derme, reposant toutes deux sur un tissu graisseux appelé l'hypoderme (fig.1).

La peau possède une formidable capacité de régénération (1). Les cellules qui la composent prennent naissance dans la couche séparant l'épiderme et le derme et, de là, elles entreprennent une migration de 28 jours qui les conduit vers l'extérieur de la peau et du même coup, vers leur mort. Cet organe possède de nombreuses fonctions sensorielles, immunologiques et biochimiques. Par sa structure, la peau prévient la perte de fluides du milieu intérieur, agit comme une membrane semi-perméable face aux liquides extérieurs et joue le rôle de barrière face aux micro-organismes (2).

La couche cornée, ou *stratum corneum* assure une protection mécanique et physique très efficace. La matrice extracellulaire du derme joue à la fois le rôle de support pour l'épiderme et celui d'emballage de toutes les structures profondes. D'autre part, l'épiderme possède tous les éléments nécessaires à la réponse immunitaire (3).





**Fig. 1 Structure de la peau (3)**

### 1.1 L'épiderme

L'épiderme est composé principalement de kératinocytes qui forment 95% de la population épidermique. Les mélanocytes sont le second type de cellules épidermiques. Ils élaborent un pigment, la mélanine, responsable de la coloration de la peau. Le troisième type cellulaire est constitué de cellules du système immunitaire, les cellules de Langerhans. Enfin, les cellules de Merkel, situées en position basale, sont des satellites des terminaisons nerveuses (15).

Les kératinocytes entreprennent un processus migratoire à partir de la couche proliférative. Durant cette migration, ils subissent une différenciation terminale qui entraîne une kératinisation pour former la couche cornée ou *stratum corneum* (24).

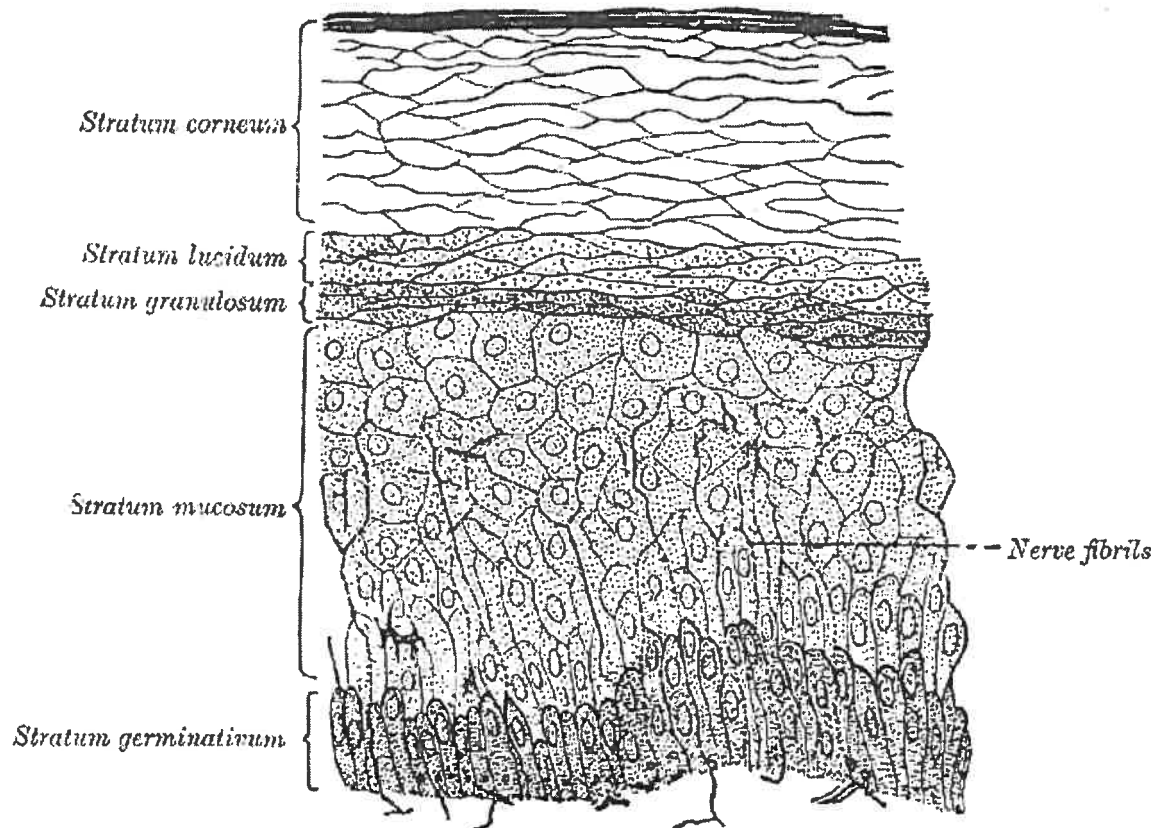
En fait, l'épiderme est un tissu qui se renouvelle selon un programme précis de différenciation. Cette génération constante est possible grâce à la présence dans la couche basale et dans la région du bulbe du poil de cellules particulières appelées cellules souches. Ces cellules ont un potentiel de prolifération très élevé bien que leur cycle cellulaire soit lent (31). Les nombreuses cellules qu'elles produisent peuvent suivre trois destins différents : rester quiescentes, être rapidement éliminées par apoptose ou, pour la plupart d'entre elles, s'engager dans un processus de différenciation afin de reconstituer les couches suprabasales de l'épiderme (6).

Lors de la différenciation, les cellules subissent des modifications morphologiques et biochimiques caractéristiques. Le terme de kératinisation est souvent employé en raison de l'abondance d'un type particulier de filaments intermédiaires appelés filaments de kératines. La différenciation du kératinocyte basal en kératinocyte suprabasal, puis en cornéocyte, s'accompagne de modifications qualitatives de la composition des kératines (11). D'autres modifications, visibles au niveau histologique, sont si caractéristiques d'un stade particulier de différenciation cellulaire qu'on a donné leur nom au compartiment épidermique dans lequel elles sont observées (5).

## 1.2 Les couches épidermiques

### 1.2.1 La couche basale ou *stratum germinativum*

La couche basale est le compartiment germinatif de l'épiderme (fig. 2). Elle ne comporte qu'une assise cellulaire constituée de kératinocytes de forme cubique, avec un grand axe perpendiculaire à la membrane basale, structure tridimensionnelle complexe faisant intervenir de nombreuses molécules extracellulaires, mais également cellulaires, en particulier les intégrines (12). L'épiderme se renouvelle en permanence et chaque cycle dure de deux à quatre semaines. Cette différenciation est liée à des interactions étroites entre l'épiderme et le derme au cours du développement embryonnaire. Dans cet environnement complexe, le kératinocyte doit réussir à maintenir un équilibre entre la prolifération et la différenciation terminale. Afin d'accomplir cette tâche, le kératinocyte doit répondre aux médiateurs extracellulaires de son environnement (8). Il est évident que les kératinocytes, les fibroblastes, les cellules dendritiques et les cellules immune/inflammatoires participent activement dans la régulation de la prolifération épidermique et de la différenciation (31).



**Fig. 2 Les couches épidermiques (3)**

### **1.2.2 La couche épineuse ou de Malpighi ou *stratum spinosum***

Elle est faite de plusieurs couches de kératinocytes polyédriques (fig. 2) qui migrent de la couche basale (107). Dès qu'ils se détachent de la membrane basale, ils acquièrent la possibilité de synthétiser de nouvelles kératines. Celles-ci sont des protéines complexes qui contribuent à rigidifier les cellules et à les rendre imperméables afin de constituer dans la couche cornée un écran limitant les pertes d'eau par évaporation (108).

### 1.2.3 La couche granuleuse ou *stratum granulosum*

Elle est faite de 2 à 3 couches de kératinocytes aplatis et constitue la dernière couche nucléée de l'épiderme. De nombreux corps lamellaires et granules de kératohyaline sont retrouvés dans cette couche, ce qui explique son nom (11).

Les granules de kératohyaline sont des agrégats de protéines insolubles (109). La loricrine, un précurseur de l'enveloppe cornée, compose certains granules de kératohyaline : d'où l'appellation granules L (110). Les granules F contiennent le précurseur de la filagrine qui est étroitement associée à la kératinisation des cellules de la couche cornée (11). En effet, la filagrine agrège les filaments de kératines et les granules de kératohyaline visibles en microscopie optique dans la couche granuleuse, disparaissent dans la matrice cytoplasmique lors de la transition de la couche granuleuse à la couche cornée (111). Les corps lamellaires qui apparaissent dans la couche épineuse sont de petits organelles sécrétoires qui proviennent de l'appareil de Golgi (31). Les kératinocytes sécrètent le contenu des corps lamellaires dans l'espace entre les cellules de la couche granuleuse (35). Les précurseurs de l'enveloppe cornée, qui ceinturera les cornéocytes, font progressivement leur apparition. L'involucrine commence à apparaître dans la couche épineuse et s'accumule dans la couche granuleuse (15). Il en est ainsi de la transglutaminase qui catalyse la formation de cette enveloppe protéique dans la couche cornée. La loricrine est un autre constituant majeur de cette enveloppe qui apparaît dans la couche granuleuse (110). En lien avec les processus cellulaires qui se déroulent dans la couche granuleuse, des organelles en métabolisme actif se retrouvent encore dans le cytoplasme des kératinocytes; ils prennent donc une part active dans les dernières étapes de la différenciation (35).

#### 1.2.4 La couche cornée ou *stratum corneum*

Elle constitue la partie la plus superficielle de l'épiderme (fig. 2) et est composée de cellules mortes, aplaties et régulièrement ordonnées comme des écailles microscopiques.

Lors du passage de la couche granuleuse à la couche cornée, la cellule de transition (cellule T) meurt dans un processus de mort programmée dans le cadre de la différenciation terminale (3). Plusieurs changements morphologiques sont observables (110). Les granules de kératohyaline se dissolvent et s'étendent dans le cytoplasme. Les macrofibrilles de kératine s'accumulent.

Les organelles cellulaires, tels les mitochondries, l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique, disparaissent progressivement au fur et à mesure que les corps lysosomiaux deviennent plus nombreux. Les organelles cellulaires, incluant le noyau, continuent à être dégradés. En parallèle, la membrane cytoplasmique s'épaissit témoignant de la formation de l'enveloppe cornée (112). Avant de devenir inerte et adaptée pour remplir sa fonction de protection, la cellule subit donc une série de modifications. Plusieurs des protéines ou des structures apparues dans la couche granuleuse, d'ailleurs utilisées à titre de marqueurs de différenciation (5), s'organisent dans la cellule de transition et deviennent fonctionnelles dans la couche cornée. Ces éléments contribuent alors au développement de la fonction de barrière, soit le principal rôle de la couche cornée.

Cette couche épidermique superficielle est constituée d'un domaine riche en protéines et d'un autre domaine riche en lipides. Les lipides intercellulaires, qui proviennent principalement des corps lamellaires, combleront l'espace intercellulaire (13). La composition des lipides change au cours de la différenciation des kératinocytes et s'accompagne d'une baisse de la synthèse lipidique totale. Ainsi, la couche cornée s'appauvrit en lipides polaires

(phospholipides) et s'enrichit en sphingolipides (céramides) ainsi qu'en lipides neutres (triglycérides, esters de stérols et de cires) et acides gras libres, stérols libres (35). Les lipides intercellulaires assureraient une meilleure cohésion entre les cornéocytes en plus d'imperméabiliser la couche cornée (32).

### 1.3 La jonction dermo-épidermique

La jonction dermo-épidermique peut être perçue comme la frontière entre le tissu épithélial et le tissu conjonctif. Elle est constituée de quatre composants : la membrane plasmique des cellules basale, la *lamina lucida*, la *lamina densa* et les éléments fibreux de la *lamina sous-basale* (6). Les fonctions de la jonction dermo-épidermique sont de :

- séparer le derme de l'épiderme (compartimentation pour éviter l'invasion cellulaire);
- donner un point d'attache à l'épiderme afin de prévenir l'apoptose (113);
- supporter le compartiment épidermique prolifératif;
- générer une polarité essentielle à la différenciation des kératinocytes;
- contrôler la perméabilité à diverses substances (114).

Sur ce dernier point, les propriétés de perméabilité de la *lamina densa*, notamment le caractère anionique des protéoglycans et la taille des espaces, jouent un rôle important dans le contrôle des échanges dermo-épidermiques (115). Comme l'épiderme est avasculaire, le passage des nutriments à travers la membrane basale revêt un caractère primordial.

### 1.4 Le derme

Le derme, situé sous la membrane basale de l'épiderme, se définit comme un tissu conjonctif constitué principalement de la matrice extracellulaire et de fibroblastes.

Les fibroblastes, d'origine mésenchymateuse, synthétisent et secrètent la presque totalité des protéines de la matrice extracellulaire qui les entoure. La substance fondamentale contient entre autres des protéoglycans et de la fibronectine qui permet les interactions cellule-matrice, les mouvements cellulaires et le contrôle de l'environnement cellulaire en matière d'hydratation et d'équilibre ionique (116). Le derme contient également les annexes pilo-sébacées et sudoripares, prolongements directs de l'épiderme (5).

Le derme apporte à la peau de la résistance, de l'extensibilité, de l'élasticité et une certaine compressibilité (rôle surtout joué par le tissu adipeux sous-cutané). Il supporte l'épiderme par l'intermédiaire de la membrane basale. L'apport de nutriments à l'épiderme est assuré par les vaisseaux sanguins dermiques. Le contrôle du débit sanguin cutané contribue à la thermorégulation de l'organisme (117).

### **1.5 L'hypoderme**

Le derme repose sur l'hypoderme, aussi appelé tissu adipeux sous-cutané, qui le sépare des muscles sous-jacents. Ce dernier est principalement constitué d'adipocytes, cellules spécialisées dans le stockage des lipides. Les follicules pileux en croissance traversent le derme et se terminent dans cette région où on retrouve aussi des glandes sudoripares et apocrines. L'hypoderme joue un rôle isolant, thermique, mécanique et de réserve énergétique (3).

### **1.6 Les annexes cutanées**

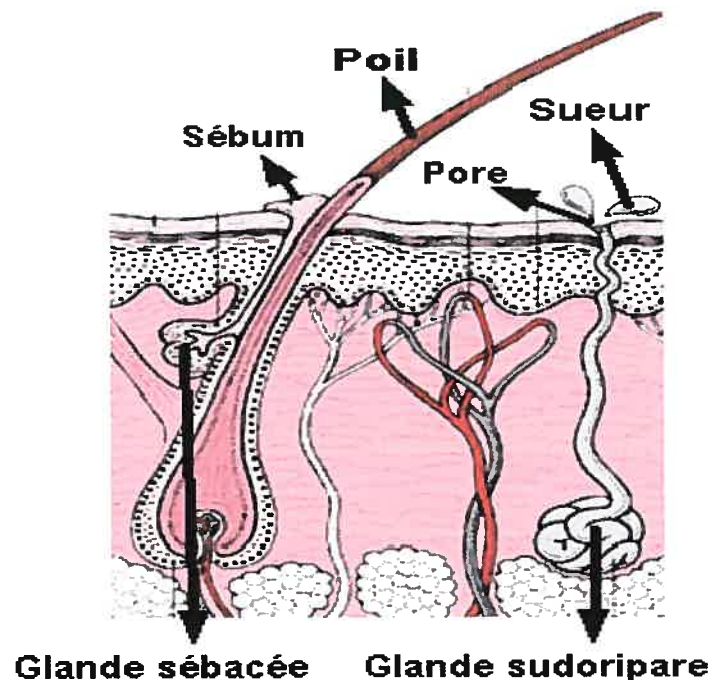
Le terme annexe cutanée décrit aussi bien les follicules pileux et les glandes sébacées qui y sont attachées (unité pilo-sébacée), que les glandes sudoripares (fig. 3).



Les poils se localisent à l'intérieur d'invaginations de l'épiderme dans le derme. Ils sont composés de kératines dures. Une gaine de cellules épithéliales les entoure. Il s'agit d'une simple prolongation de l'épiderme qui prend le nom de follicule pileux au niveau de la racine du poil (118).

Les glandes sébacées sécrètent le sébum qui a le rôle de protéger les poils et la peau par l'élaboration du film hydrolipidique cutané et ses propriétés bactériostatiques.

Les glandes sudoripares, présentes dans le derme profond, sécrètent par exocytose la transpiration à la surface de la peau par l'intermédiaire de canaux excréteurs (119). En s'évaporant, la transpiration permet de réduire la température corporelle (120).



**Fig. 3 Les annexes cutanées (6)**

## **2. Ultrastructures épidermiques**

### **2.1 Assemblage des kératinocytes**

La formation des cornéocytes apparaît comme une série d'événements des mieux orchestrés. Différentes protéines y sont exprimées tout au long de la maturation cellulaire sur une période comprise entre deux et quatre semaines.

La différenciation progressive des cellules de la membrane basale vers la surface de l'épiderme s'accompagne d'une multitude de changements (3,9). La différenciation, processus programmé génétiquement, s'observe en microscopie par des changements structuraux observés au sein des diverses couches épidermiques (10,11). Les changements subis par la cellule sont très diversifiés et caractérisés par les étapes suivantes:

- la synthèse et la modification de protéines de structure ;
- l'apparition, la réorganisation puis la perte d'organelles;
- l'augmentation de la taille et l'aplatissement des cellules;
- le changement d'un métabolisme général à un métabolisme spécialisé en relation avec la kératinisation et la dégradation d'organelles;
- la modification des propriétés de la membrane cytoplasmique, des antigènes de surface et des récepteurs;
- la déshydratation progressive du cytoplasme.

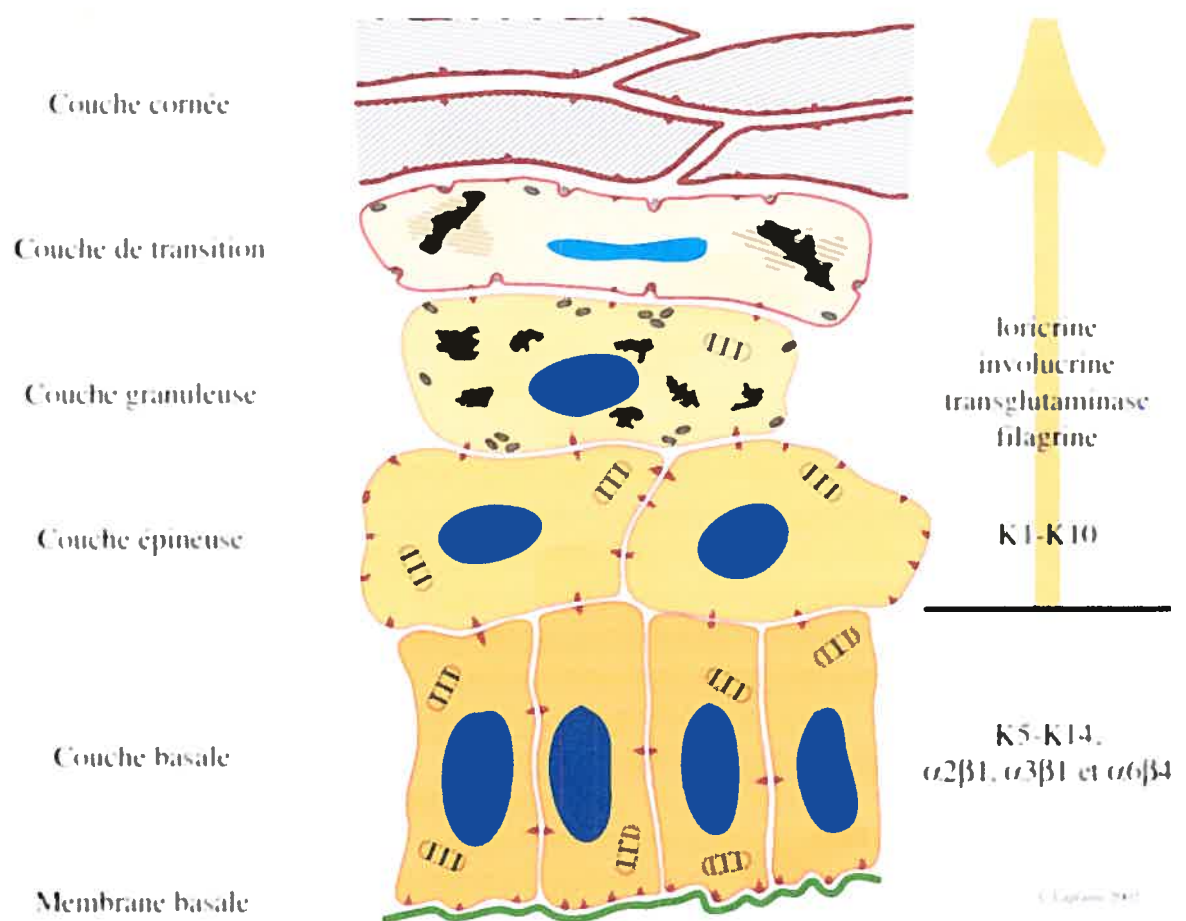
En se différenciant, la cellule devient de plus en plus spécialisée et limitée dans ses structures et ses fonctions. Au terme de la différenciation, la cellule est devenue une masse de kératines pratiquement inertes (12). La différenciation d'un kératinocyte à partir de la couche basale jusqu'à sa desquamation prend environ 28 jours (13). De la couche basale jusqu'à la couche granuleuse, il s'écoule environ 14 jours. Puis, les cellules séjournent approximativement 14 jours supplémentaires dans la couche cornée. Le temps

de renouvellement complet de l'épiderme, évalué entre 52 et 75 jours, dépend du stress qui lui est imposé (14). La couche basale, composée majoritairement de kératinocytes, possède des cellules peu différenciées (10 % des cellules) ainsi que d'autres types cellulaires. Les cellules souches, dotées d'abondants mélanosomes (vésicules de mélanine) pour protéger leur noyau des rayons ultraviolets, assurent le renouvellement constant de l'épiderme à partir duquel les cellules différenciées desquament (12).

Les cellules souches, suite à leur mitose, peuvent donner naissance à d'autres cellules souches pour ainsi assurer le renouvellement du compartiment souche ou produire des cellules filles différenciées. Parmi ces cellules filles plus différenciées que leur cellule mère se trouvent des cellules amplificatrices transitoires qui vont subir quelques cycles de multiplication afin de générer une population de kératinocytes qui vont sortir irréversiblement du cycle cellulaire et se différencier. Une fois différenciée en kératinocyte, une cellule basale va, après un temps plus ou moins long, progresser vers la couche supérieure, c'est à-dire la couche épineuse, puis compléter sa différenciation d'une couche à l'autre vers la surface (15). La différenciation terminale des kératinocytes évolue vers une mort cellulaire programmée. La différenciation terminale et l'apoptose seraient cependant deux processus distincts, mais dépendant l'un de l'autre (16). Ces mécanismes seraient tous deux présents dans l'épiderme. L'apoptose ne semble cependant pas avoir une contribution significative à l'homéostasie épidermique dans des conditions normales (17).

La cellule meurt lentement (jours-semaines) au cours de la différenciation terminale, alors qu'elle est éliminée rapidement (minutes-heures) durant l'apoptose (18). La différenciation terminale fait appel à certains gènes spécifiques aux kératinocytes (fig. 4) (19). Les principaux d'entre eux sont : la loricrine, l'involucrine, la kératoline, la transglutaminase et d'autres protéines minoritaires. Plusieurs modèles suggèrent l'involucrine en tant que premier substrat utilisé dans l'activité de transglutaminase (20). Cette propriété de

kératinisation qu'ont les kératinocytes associée à celle d'être des cellules très jointives grâce à leurs nombreuses jonctions cellulaires assurent à l'épiderme une résistance élevée aux insultes de l'environnement (21). Les cellules de la couche cornée, certes mortes mais protectrices, desquament et sont remplacées par d'autres grâce à la prolifération des cellules basales de telle sorte que la perte et la multiplication cellulaire soient bien équilibrées (22).



**Fig. 4 Expression de différentes protéines dans les couches de la peau**

## 2.2 Expression des kératines lors de la différenciation cellulaire

Les kératines sont des constituants cyto-squelettiques importants des cellules épithéliales. Elles sont présentes à travers tout l'épiderme; de la couche basale jusqu'au *stratum corneum*. Jusqu'à présent environ 30 sortes de kératines sont connues. Elles peuvent être divisées en 2 sous-familles sur la base de leur séquence en acides aminés et de leur point isoélectrique : les kératines de type I, numérotées de 9 à 20, sont les membres de la sous-famille acide; et les kératines de type II, numérotées de 1 à 8, les membres de la sous-famille basique. Des analyses détaillées ont révélé que chaque type cellulaire exprime au moins une chaîne de kératines de type acide (type I) et au moins une chaîne de kératines de type basique (type II) (23). Le rôle exact des kératines est encore largement inconnu. Il n'en demeure pas moins qu'elles assurent un rôle structural important en tant que constituants protéiques des cellules de l'épiderme et qu'elles sont, de par leur expression séquentielle, de bons marqueurs pour chacune des étapes de la maturation cellulaire.

En effet, les premières exprimées par l'épiderme embryonnaire sont les kératines 8, 18 et 19. Leur expression est retrouvée dans la plupart des épithélia simples adultes, alors qu'elle est fortement diminuée dans les épithélia stratifiés, pour être presque absente dans l'épiderme. Les kératines 5 et 14 sont présentes dans la couche basale mais disparaissent dans les couches supra basales probablement parce qu'elles y sont rapidement dégradées. Inversement, les kératines 1 et 10 sont généralement absentes des cellules de la couche basale, mais se retrouvent largement présentes dans les couches supra basales jusqu'à la différenciation terminale (24). Les kératines 6, 16 ainsi que la kératine 17 sont absentes de l'épiderme humain normal mais largement exprimées lors d'un processus de guérison cutanée ou encore dans un épiderme psoriasis, ainsi que dans certaines tumeurs (25).

### 3. Structures et fonction des lipides épidermiques

Dans l'organisme, les lipides sont présents dans toutes les cellules, mais parallèlement aux lipides circulants, il existe des lipides destinés à être libérés au niveau de la peau. Les lipides cutanés de surface représentent chez l'homme l'ultime frontière entre l'organisme et l'environnement. La couche cornée est composée de cornéocytes entourés d'une matrice extracellulaire riche en lipides, représentés par les céramides, le cholestérol et les acides gras libres (26). Ces lipides sont synthétisés dans les kératinocytes de l'épiderme viable, confectionnés en petits paquets intracellulaires appelés corpuscules lamellaires, et finalement excrétés dans l'espace extracellulaire de la couche cornée où ils s'organisent en membranes lamellaires. La production de ces corpuscules lamellaires répond aux altérations de la barrière cutanée et assure sa régénération continue. Des défauts de métabolisme des lipides sont associés à des troubles cutanés caractérisés par une xérose cutanée, comme les ichthyoses (27) ou la dermatite atopique (28). Des altérations cutanées similaires s'observent parfois comme effet secondaire chez des patients traités par des statines (29).

Les lipides intercellulaires, qui proviennent principalement des corps lamellaires, comblent l'espace intercellulaire (30). La composition des lipides change au cours de la différenciation des kératinocytes et s'accompagne d'une baisse de la synthèse lipidique totale. Ainsi, la couche cornée s'appauvrit en lipides polaires (phospholipides) et s'enrichit en sphingolipides (céramides) ainsi qu'en lipides neutres (triglycérides, esters de stérols et de cires), acides gras libres et stérols libres (31). Les lipides intercellulaires assureraient une meilleure cohésion entre les cornéocytes (32) en plus d'imperméabiliser la couche cornée (33).

### 3.1 Origine des lipides cutanés de surface

Même si ces lipides de surface sont caractérisés par une sécrétion particulière, leur métabolisme possède des points communs avec celui des lipides de l'organisme, notamment en ce qui a trait aux précurseurs et aux enzymes.

Il faut savoir que les lipides cutanés de surface humains forment une couverture unique où certains constituants lipidiques sont spécifiques de la peau et ne sont synthétisés nulle part ailleurs dans l'organisme (34). (tableau I).

Composés	Origine	Caractéristiques
Phospholipides	Épiderme	Sphingolipides glycophospholipides
Stérols	Épiderme	Cholestérol et ses précurseurs
Acides gras libres	Épiderme et glande sébacée	De C <sub>10</sub> à C <sub>20</sub> saturés
Triglycérides	Épiderme et glande sébacée	De C <sub>10</sub> à C <sub>20</sub> saturés et non saturés
Cires	Glande sébacée	De C <sub>10</sub> à C <sub>20</sub> saturés et non saturés
Stérol. Esters	Épiderme	Estérifiés par acides gras libres sébacés et épiderme
Squalène	Glande sébacée	Précurseur du cholestérol

**Tableau I. Les principaux composants des lipides cutanés de surface chez l'homme**

De plus, chaque sujet possède une formule lipidique qui lui est propre : cette formule, hormono-dépendante, évolue au cours de la vie. Contrairement aux lipides internes, dont les rôles sont bien déterminés, les fonctions des lipides cutanés sont encore mal connues.

Les lipides cutanés de surface chez l'homme ont deux origines distinctes : l'épiderme et les glandes sébacées.

### **3.2 Les lipides épidermiques**

L'élimination continuelle des cellules cornées a pour conséquence la libération à la surface de la peau de composants de ces cellules, c'est-à-dire :

- des stérols, principalement le cholestérol libre ou estérifié par des acides gras à longues chaînes.
- des triglycérides soumis, soit aux lipases de la flore cutanée, soit aux estérases libérées par la kératinisation.
- des traces de glyco- ou phospholipides, lipides polaires d'origine membranaire.

Tout comme les lipides sébacés, les lipides épidermiques sont sensibles à l'action des hormones sexuelle (androgènes et œstrogènes) (35).

### **3.3 Les lipides des glandes sébacées**

La glande sébacée est une glande holocrine, d'origine epiblastique, faisant partie d'une unité fonctionnelle, le follicule pilo-sébacé. Elle est située dans le derme moyen. Chaque glande multilobée se présente comme un appendice sacciforme accolé au follicule pileux qui lui a donné naissance. Les glandes sébacées persistent sur tout le corps, sauf au niveau des paumes des mains, des plantes des pieds et de la lèvre inférieure. Elles sont grandes et plus nombreuses sur le visage, particulièrement sur le front et la partie supérieure du dos. De ce fait, la proportion de sébum dans les lipides cutanés d'une région



donnée est fonction de la répartition des glandes sébacées dans cette région (36). Sous l'influence hormonale, les cellules sébacées naissent de la division des cellules indifférenciées germinatives, proches par leur structure des kératinocytes de la couche basale de l'épiderme. Ces cellules sont situées à la périphérie du sac sébacé à l'intérieur des lobules, sous forme de constructions irrégulières. Les cellules-filles résultant de la division des cellules indifférenciées, poussées par de nouvelles générations cellulaires, migrent vers le canal excréteur du lobe sébacé. Dès qu'elles ont quitté la couche basale, leur structure et leur forme se modifient, elles perdent le pouvoir de se diviser ou de former de la kératine, et commencent une différenciation vers la production de lipides (sébocytes) (37). Les lipides s'accumulent dans les vacuoles, dont la taille augmente au fur et à mesure de la migration cellulaire. A la fin de la migration centripète, les sébocytes se désintègrent, probablement grâce à une activation lysosomiale, libérant ainsi les produits synthétisés :

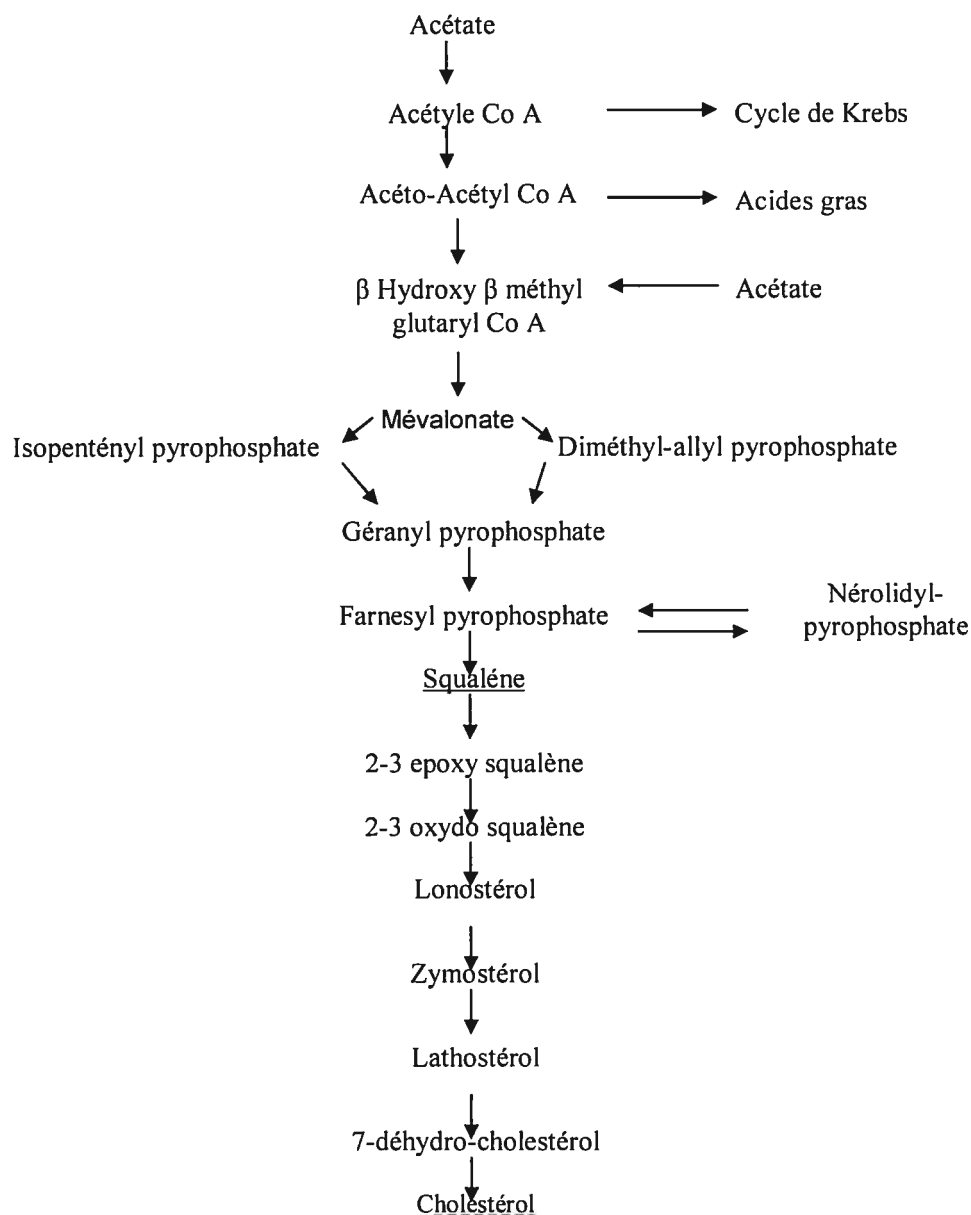
- les acides gras sous forme d'esters
- les molécules des squalène

Ce mélange natif est privé d'acides gras libres et est continuellement sécrété par la glande selon un turn-over de huit à dix jours, chez les sujets jeunes, mais pouvant atteindre vingt-cinq jours chez les sujets âgés (38). Le sébum s'accumule progressivement dans le canal pilo-sébacé (réservoir folliculaire). Dans le canal, vont être présents :

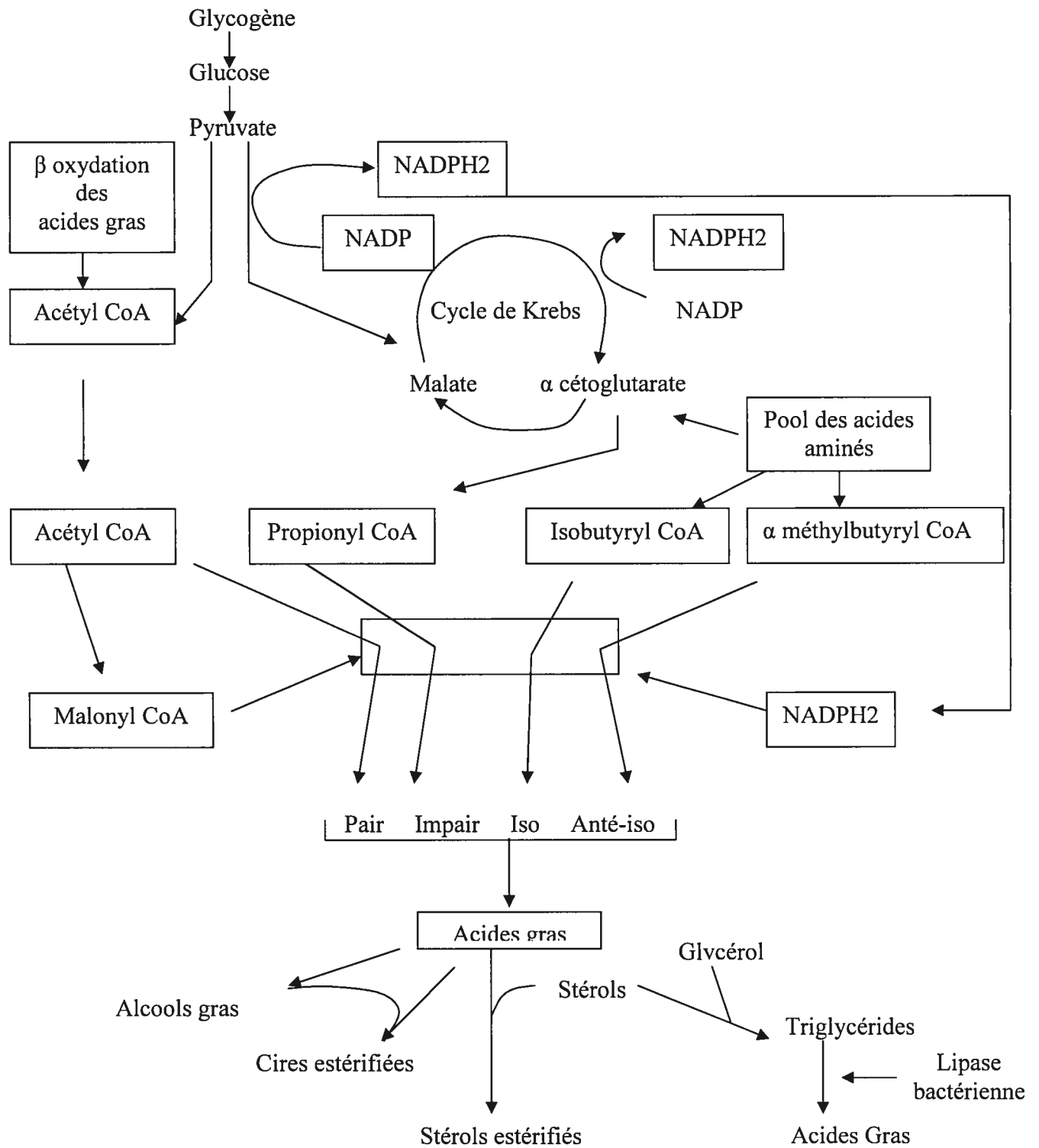
- des débris de cellules cornées
- des microorganismes (Propionibacterium acnes, Staphylococcus epidermidis, Pityrosporum ovale)
- de l'eau et des composés hydrosolubles

### 3.4 Mécanisme de synthèse des lipides cutanés de surface

La synthèse des lipides cutanés se fait par deux voies métaboliques, l'une étant responsable de la synthèse du squalène et du cholestérol (fig. 5), tandis que l'autre voie conduit à la synthèse des acides gras, des triglycérides, des cires estérifiées et des stérols estérifiés (fig. 6) (39). Les acides gras obtenus sont spécifiques (certains ne sont retrouvés que dans la peau) mais aussi leur profil est caractéristique pour la peau.



**Fig. 5 Étapes de la biosynthèse du squalène et du cholestérol**



**Fig. 6 Étapes de la biosynthèse des acides gras, des alcools gras, des cires estérifiées, des stérols estérifiés et des triglycérides**

### 3.5 Les acides gras libres

La surface de la peau contient une bonne concentration d'acides gras libres, lesquels proviennent pour la plupart de l'hydrolyse des glycérides sébacés. Les acides gras sont présents dans les lipides cutanés, libres ou liés aux triglycérides, aux cires estérifiées, au cholestérol et aux stérols. Ces acides gras comprennent des acides gras saturés ou insaturés en C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub>, tels que les acides stéarique, palmitique, oléique et linoléique. De plus, les acides gras cutanés sont remarquables par la longueur de leurs chaînes : de 4 à plus de 30 atomes de carbone avec une prépondérance pour les chaînes en C<sub>16</sub> (40).

La présence d'une double liaison entre les carbones 6 et 7 est tout à fait caractéristique des acides gras cutanés. La double liaison ( $\Delta$ ) entre les carbones 9 et 10, présente dans les lipides internes est retrouvée dans les lipides cutanés. Il apparaît que les acides gras insaturés en  $\Delta 6$  seraient pratiquement tous d'origines sébacées, alors que les acides gras insaturés en  $\Delta 9$  seraient surtout d'origine épidermique. Des études ont montré que dans les lipides cutanés chez l'adulte, la majorité des acides gras est de type  $\Delta 6$ , tandis que dans le Vernix caseosa, il est possible de trouver des acides gras insaturés en  $\Delta 9$  (41). Au contraire, les acides gras  $\Delta 9$  insaturés sont plus spécifiques chez les enfants et chez les personnes âgées.

La synthèse des acides gras requiert un *starter* (l'acétyle Coenzyme A) suivi d'un système enzymatique.

### 3.6 Les triglycérides

Les triglycérides représentent le constituant majeur des lipides cutanés de surface. Ils sont obtenus par l'estérification du glycérol par 3 chaînes d'acides gras. Ces triglycérides, libérés par la glande sébacée, vont être la cible des microorganismes qui se trouvent dans le canal pilo-sébacé et aussi à la surface

de la peau. Les lipases bactériennes vont libérer des mono- et diglycérides et finalement des acides gras libres et du glycérol. Les études ont montré que quelques-uns des acides gras libres présents à la surface de la peau sont une source pour la synthèse lipidique de ces bactéries (42).

### **3.7 Le squalène**

Le squalène, un autre constituant du sébum, est un marqueur de la sécrétion sébacée et un précurseur de la synthèse du cholestérol.

Ce composé est présent en quantité très faible dans les autres tissus.

La sécrétion du sébum est influencée par l'âge. Ainsi, l'excrétion sébacée est maximale entre 26 et 40 ans et est généralement plus importante chez les hommes que chez les femmes (43). Strauss et Pochi ont démontré que la sécrétion sébacée diminuait vers 50 ans chez les femmes et 60 ans chez les hommes. À chaque diminution de la sécrétion correspond une augmentation du taux du cholestérol dans les lipides épidermiques (44).

### **3.8 Autres rôles des lipides épidermiques : rétention de l'eau cutanée, et contrôle de la desquamation**

Une notion relativement plus récente, et distincte de celle de barrière hydrique de la peau, est celle du pouvoir de rétention de l'eau au niveau de l'épiderme, participant à la souplesse et à la flexibilité de la peau (45). Cette fonction serait associée à des céramides comportant des acides gras relativement courts, alors que la fonction de barrière hydrique de l'épiderme serait plutôt liée aux céramides à longue chaîne et aux acylcéramides (46).

## 4. Pathophysiologie de la peau

### 4.1 Les ichthyoses

Les ichthyoses constituent un groupe hétérogène de maladies dermatologiques, caractérisées par une peau extrêmement sèche, avec épaissement de la couche cornée de la peau et accumulation de squames, dont l'aspect évoque des écailles de poisson (47). La peau sèche est un problème fréquent en dermatologie et en même temps le signe d'un dysfonctionnement de l'épiderme, notamment du *stratum corneum* en tant que représentant morphologique de la barrière cutanée (48). Elle apparaît à la suite d'une disposition individuelle ou comme symptôme majeur de la dermatite atopique ou de l'ichthyose (49).

De nombreuses formes d'ichthyose ont été décrites, mais leur classification est parfois difficile, en raison d'une grande hétérogénéité clinique et génétique. Le *stratum corneum* est le siège le plus caractéristique de l'anomalie dans toutes les ichthyoses. L'ichthyose peut être la manifestation d'une production accrue de *stratum corneum* (hyperprolifération), comme cela se produit dans l'hyperkératose épidermique, le «*corneocyte abnormal shedding*», ou encore l'ichthyosis lamellaire (50).

Dans toutes les ichthyoses, il existe une augmentation d'épaisseur de la couche cornée qui aboutit cliniquement à un aspect en écailles de la peau, d'où le nom d'ichthyoses.

- Les ichthyose vulgaires sont des ichthyoses par rétention avec morphologiquement une absence ou diminution des grains des kératohyaline et biochimiquement une diminution de l'expression de la profilaggrine par anomalie post-transcriptionnelle. Elle est la plus fréquente. Sa transmission est autosomique dominante. Cette ichthyose peut être très légère, marquée par une

simple sécheresse de la peau. Elle peut être associée à un eczéma constitutionnel. Elle s'aggrave en hiver et s'améliore en été (51).

- L'ichtyose liée au sexe est aussi une ichtyose par rétention, par absence de desquamation des cornéocytes en rapport avec une anomalie de la stéroïde sulfatase (anomalie en rapport suivant les cas avec des délétions ou des mutations à la partie distale du bras court du chromosome X). Ichtyose récessive liée au chromosome X est une forme rare d'ichtyose de transmission récessive liée au chromosome X. Les femmes sont le vecteur et la maladie ne touche que les garçons. Parmi les nombreuses maladies de peau connues, l'ichthyose récessive, qui se caractérise par l'absence de desquamation, a été associée à une modification de la matrice lipidique (52). Son mécanisme est parfaitement connu : il s'agit d'un déficit en stéroïde sulfatase, enzyme qui intervient dans la chaîne de dégradation du cholestérol.

Récemment, en étudiant six familles atteintes d'une forme récessive de l'ichthyose une équipe de chercheurs a identifié des mutations sur deux gènes codant pour des enzymes qui jouent un rôle important dans l'hydratation de la peau, des lipoxygénases. Ces deux gènes sont localisés sur le chromosome 17 (53).

Les autres ichthyoses sont des ichthyoses par prolifération avec une granuleuse d'épaisseur normale ou augmentée. Il n'a pas été régulièrement décrit d'anomalies morphologiques cohérentes avec les anomalies génétiques responsables de ces maladies. L'ichthyose lamellaire est secondaire, dans certaines familles, à une mutation sur le gène de la transglutaminase I (région chromosomique 14q11) (54). Le gène d'une autre forme appelée l'ichthyose lamellaire de type 2, a été localisé sur le chromosome 2q33-q35. L'ichthyose lamellaire de type 2 (IL2) maladie autosomique récessive rare, est caractérisée par des mutations du gène ABCA12. Ainsi, l'isolement du gène ABCA12 dans l'ichthyose lamellaire de type 2 permettra probablement de mieux comprendre le

fonctionnement de la barrière dermo-épidermique, ainsi que la fonction des lipides dans la peau (55).

L'ichtyose lamellaire de type 3 a été identifiée récemment dans des familles avec un fort taux de consanguinité ; la transmission est autosomique récessive et deux loci respectivement en 19p12-q12 et 3p21 ont été trouvés. Le dernier correspond au gène NCIE2 (Non Bullous Congenital Ichtyosiform Erythroderma). Enfin dans deux familles, l'une turque, l'autre allemande, on a découvert un lien entre une ichtyose congénitale de transmission autosomique récessive et une localisation en 17p13.2-13.1 (56).

- L'érythrodermie congénitale ichtyosiforme non-bulleuse

Est une variété très rare d'ichtyose, marquée le plus souvent dès la naissance par un tableau clinique typique de « bébé collodion ». Dans ce groupe, plusieurs entités cliniques, telles l'Erythrodermie Congénitale Ichtyosiforme Sèche (ECIS) et l'ichtyose lamellaire, ont été décrites. Plusieurs phénotypes ont été décrits selon la présence ou non d'érythème, la taille des squames, l'existence ou non de lésions palmo-plantaires et unguéales, le degré d'ectropion, l'atteinte du cuir chevelu, l'intensité du prurit et des phénomènes d'intolérance à la chaleur.

- L'érythrodermie congénitale ichtyosiforme bulleuse. C'est une variété très rare d'ichtyose dont la forme majeure est marquée, dès la naissance, par un aspect de bébé « ébouillanté » puis, pendant la petite enfance, par la prédominance de bulles et d'érosions et ensuite par une hyperkératose. Sa transmission est autosomique dominant. Des mutations ont été identifiées au niveau des gènes codant pour les kératines 1 et 10 (KRT1, KRT10). C'est un moyen de la peau de se protéger de sa fragilité sous-jacente (57).

- Les ichtyoses rares congénitales sévères. Le plus souvent, elles s'intègrent dans une maladie plus générale, par exemple le syndrome de



Sjögren-Larsson qui associe une ichtyose congénitale, une quadriplégie (paralysie des quatre membres) et une atteinte rétinienne. Jusqu'à présent on n'a pas trouvé de remède contre cette maladie génétique. Ces ichthyoses sont un groupe hétérogène de maladies responsables d'une altération majeure de la qualité de vie et se caractérisent par une desquamation très importante de la peau sur l'ensemble du corps, très souvent associée à un érythème (58). Tandis que les formes graves d'ichtyose héréditaire sont habituellement présentes à la naissance, plusieurs types d'ichtyose héréditaire peuvent se développer plus tard dans la vie. Certaines ichthyoses débutent soit par un érythème squameux généralisé, soit par des bulles.

#### **4.2 Le syndrome de Chanarin-Dorfman**

Le syndrome de Chanarin-Dorfman (SC-D) est un trouble héréditaire du métabolisme des lipides neutres, de transmission autosomale récessive (59), caractérisé par un dépôt intracellulaire de triglycérides dans la plupart des tissus, et sur le plan phénotypique par une érythrodermie ichtyosiforme congénitale sèche (EICS), associée à des anomalies du système nerveux centrale (SNC), de la vision et de l'audition, un déficit musculaire et une stéatose hépatique. Depuis les premiers rapports du désordre, 30 patients ont été décrits dans la littérature, la plupart d'entre eux provenant des pays du Moyen Orient.

Manifestation	Nr de patientes	%	JB et LB
Ichtyose	33	100	2
Vacuoles des lipides dans leucocytes	33	100	2
Symptômes hépatiques	21	64	1
Symptômes musculaires	20	61	1
Symptômes ophtalmologiques	18	55	1
-Cataractes	14	42	
-Nystagmus	3	9	
-Strabisme	4	12	1
-Myopie	3	9	
Perte auditive	10	30	
Retardement mental	8	24	
Microcéphalie	5	15	
Splénomégalie	8	24	
Petite stature	7	21	
Symptômes intestinaux	3	9	

**Tableau II Le syndrome de Chanarin-Dorfman : comparaison avec l'ichtyose huileuse (122).**

Les patients avec ce syndrome présentent un tableau d'EICS, associé à un strabisme (2 cas), une hépatomégalie (4 cas), des myalgies (3 cas), un retard mental (2 cas) et de la surdité (1 cas) (tableau II) (60). Aucune modification des cheveux, des ongles, des dents, ou des muqueuses n'a été rapportée. La plupart des analyses de sang, y compris celles des lipides du sérum, sont normales, mais des enzymes musculaires et hépatiques s'avèrent souvent être modérément élevées (deux à trois fois la normale). L'histologie cutanée démontre une hyperkératose orthokératosique et une hypergranulose sans acantholyse. Des vacuoles lipidiques dans les kératinocytes de la couche basale et granuleuse ont été retrouvées chez les patients atteints de ce syndrome.

Le frottis sanguin montre des vacuoles lipidiques dans le cytoplasme de toutes les cellules polynucléaires, ce qui a permis d'identifier les porteurs hétérozygotes chez les parents des patients.

Une étude génétique basée sur l'analyse de liaison et des haplotypes a montré la présence de 3 mutations homozygotes différentes : une mutation d'épissage sur l'exon 3 et deux mutations ponctuelles sur l'exon 2 et 3 dans le gène CGI-58. En 2001, les mutations CGI-58 ont été identifiées dans des familles avec le syndrome de Chanarin-Dorfman de la région méditerranéenne (61). En outre, pour clarifier si les mutations CGI-58 causent des anomalies de kératinization, d'autres gènes impliqués dans la différenciation épidermique, comme la transglutaminase, ont été analysés sur les échantillons épidermiques provenant de patients avec CGI-58 défectueux (61).

## Description du projet de recherche

Nos connaissances actuelles sur les mécanismes du déclenchement de l'ichtyose huileuse chez les jumelles monozygotes restent encore limitées. L'hypothèse de départ de ce projet de recherche était que l'ichtyose huileuse représente une forme atypique du syndrome de Chanarin-Dorfman.

L'**objectif général** du projet est de tenter d'élucider les mécanismes cellulaires responsables des problèmes d'hyperprolifération et d'hypersécrétion de l'épiderme.

Afin d'obtenir des informations sur la fonctionnalité de l'épiderme nous avons travaillé en collaboration avec le Dr Lucie Germain, du laboratoire d'organogenèse expérimentale (LOEX), Université Laval, Québec. Avec son aide, nous avons pu établir des cultures primaires à partir des kératinocytes des patients ainsi que des reconstitutions de peau.

Le **deuxième objectif** était d'identifier les facteurs génétiques impliqués dans l'étiologie de cette maladie. À cette fin nous avons séquencé certains gènes qui sont 1) exprimés pendant la différenciation cellulaire 2) impliqués dans le métabolisme des lipides de la peau ou encore 3) responsables d'autres formes d'ichtyose. Nous avons aussi analysé la composition en lipides des sécrétions de la peau et regardé l'expression et l'activité de certains gènes impliqués dans le métabolisme des lipides.

Le **troisième objectif** était de valider ou éliminer le syndrome de Chanarin-Dorfman comme responsable de cette phénotype.

## 5. MATÉRIELS ET MÉTHODE

### 5.1 Biopsies

Des biopsies cutanées des patientes atteintes de la maladie, LB (région non atteinte) et JB (région atteinte), et de leur famille immédiate mère (E), père (P) ont été expédiées au Laboratoire d'organogenèse expérimentale (LOEX) dans un milieu de transport composé de Eagle Dulbecco-Vogt avec du Ham en proportion 3 : 1 (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada), 10% de sérum de veau fœtal (Hyclone) et 100 UI/ml de pénicilline G (Sigma), maintenu à 4°C. À la réception, une partie des spécimens a été fixée au glutaraldéhyde (2.5%) et enrobée dans l'épon pour des études ultérieures. Des coupes minces colorées au bleu de méthylène ont été utilisées pour les études histologiques. Une autre portion des spécimens a servi à l'extraction des kératinocytes et une dernière portion a été congelée dans l'OCT (Optimal Cutting Temperature, Miles, inc. Diagnostic Division, Elkhart, IN.)

### 5.2 Culture cellulaire

Les kératinocytes ont été extraits par la technique de thermolysine (62) à partir des biopsies de LB, JB, du père (P), de la mère (M), ainsi que d'une jeune fille de 16 ans (Km) et d'un nouveau-né (Kp) en guise de contrôles. Les kératinocytes ont étéensemencés dans des flacons de culture cellulaire de plastique en présence de fibroblastes 3T3 de souris irradiés (ATCC) dans du milieu DME-Ham complet : une combinaison de milieu Eagle DulbeccoVogt avec du Ham en proportion 3 : 1 supplémenté avec 5 µg/ml d'insuline (Sigma),  $2 \times 10^{-9}$  M 3, 3, 5, triiodo-L-thyronine (Sigma), 0,4 µg/ml hydrocortisone (Calbiochem, La jolla, CA),  $10^{-10}$  M toxine de choléra (ICN Biochemical, Montréal, Québec), 10% de sérum de veau fœtal (Hyclone), 10 ng/ml EGF (Austral Biological, San Ramon) et 100 UI/ml de pénicilline G. Pour l'étude de

l'expression des gènes en mono couche, les kératinocytes ont été décongelés en P2 et cultivés en P3 et P4.

### **5.3 Préparation et culture des peaux reconstruites**

Les dermes ont été produits à partir de fibroblastes normaux (réduction mammaire, fille 23 ans) en passage 6 et mis en culture pendant 35 jours dans du DME 10% de sérum de veau fœtal en présence de 50 µg/ml d'acide ascorbique pour permettre l'organisation de la matrice de collagène (121). Deux feuillets fibroblastiques ainsi formés ont été superposés à la surface d'un pétri et maintenus à l'aide d'ancrages. Après une semaine de maturation, les kératinocytes des différentes lignées (LB-B1, JB-B2, E, P, Km et Kp) ont étéensemencés sur la matrice dermique à raison de 160 000 cellules/cm<sup>2</sup>. Après une semaine de culture immergée dans du DME HAM's complet (50 µg/ml d'acide ascorbique), soit jusqu'à confluence des kératinocytes, les peaux reconstruites ont été montées à l'interface air/liquide et cultivées dans du DME HAM's complet (50 µg/ml d'acide ascorbique) sans EGF afin de permettre la pluristratification des épidermes reconstruits. Tout au long de l'expérience, les milieux ont été changés trois fois par semaine. Des biopsies ont été effectuées après 7 jours de culture immergée (1 expérience dans laquelle chaque condition était en duplicata), ainsi que 7 jours, 14 jours et 21 jours de culture air/liquide.

### **5.4 Analyse histologique des peaux reconstruites**

Les peaux reconstruites ont été fixées avec une solution de Bouin et enrobées dans de la paraffine. Des coupes de 4 µm ont été colorées au trichrome de Masson et observées à l'aide d'un microscope Nikon Eclipse E600. Une camera CCD coolsnap a été utilisée pour prendre les micrographies.

## 5.5 Immunofluorescence

L'immunomarquage a eu lieu sur des cryosections de 4  $\mu$ m, fixées à l'acétone, provenant des biopsies cutanées des patientes et des peaux reconstruites à partir des cellules des patients. Les anticorps utilisés pour les marquages se trouvent dans le tableau III. Le premier anticorps a été incubé pendant 45 minutes et le deuxième pendant 30 minutes. Les noyaux ont été mis en évidence par une solution Hoechst dilué 1 : 100. Chaque incubation a été suivie par des rinçages au PBS. Afin d'évaluer le bruit de fond de chaque anticorps secondaire, des contrôles négatifs sans premier anticorps ont été effectués. Les marquages ont été observés à l'aide d'un microscope Nikon Eclipse E600. Une caméra CCD Sensys fut utilisée pour prendre les micrographies. Les montages couleur ont été effectués à l'aide du logiciel Adobe Photoshop 6.0.

Anticorps	Type Ig	Réactivité	Provenance	Utilisation (dilution)
<b>1<sup>ier</sup> Anticorps</b>				
RKSE60	Souris IgG <sub>1</sub>	K10 Humain	Monosan #1015N	IF (1:5, 1:10) Western bolt (1:250)
Filaggrin	Souris IgG	Filaggrine humaine	BTI Lot : 5760899	IF :1 :200
<b>2<sup>ième</sup> Anticorps</b>				
TRITC	Chèvre	IgG-IgM de souris	Chemicon, 20010333	IF (1:100)

**Tableau III. Anticorps utilisés**

## **5.6 Extraction de l'ADN génomique et amplification des exons pour séquençage**

L'ADN génomique a été extrait à partir de 10 ml de sang avec la trousse d'extraction QIAamp<sup>®</sup> DNA suivant le protocole fourni par la compagnie. L'ADN a été quantifié par spectrophotométrie. 50 ng d'ADN génomique, dans un volume total de 45 µl ont été amplifiés par PCR. Après une dénaturation initiale de 3 minutes à 96°C, 5U/µL de Taq DNA polymérase (Amersham Biosciences) ont été ajoutés à 94°C (hot start), et 35 cycles d'amplification ont été exécutés selon la séquence suivante : 40 secondes à 94°C, 30 secondes à 55-60°C (selon le  $t_m$  des amorces) et 30 secondes d'élongation à 72°C, suivi d'une période d'élongation terminale de 10 minutes.

La séquence des oligos utilisés pour l'amplification et la longueur des fragments obtenus est décrite dans le tableau IV pour les gènes CGI58, SCD1 et DGAT2.



Sequence 5'-3'			Fragment (pb)
	Sens	Antisens	
<b>CGI58</b>			
Exon 1	ATAAGTCCCGGGCTTGCCCGCCGGCGGCT	GGTGGCTTATACAACAACGGGGCGGACCCTCC	375
Exon 2	CCATGCTTTGTGCATGTTAG	AAACAAATCTCCTTGGGGTC	483
Exon 3	AGAGAATGTCTGCCTTGTTG	TGAGGTAGGTCTTCCCCTTT	692
Exon 4	GGGTTTCAGGGTTTTCTTGTT	CGTGAAGGTTTTTGAAGGTG	376
Exon 5	GACCTGGGGTCAGAAAGTTCA	AATGTGTGCTTTTCCCACC	621
Exon 6	GTAGTTCACGGTTTGGACAT	CTTAGGTGCTGGAAAAGCTA	301
Exon 7	TCAGAAATCACTTCCTAAATTGG	TTTAAATACAGTGGCTCTCACTT	473
<b>SCD1</b>			
Exon 1	CAATGACGAGCCGGAGTTTA	CAGGCTGGGAAACTCACATC	500
Exon 2	GTCCGTA CTGTCCACCCTTC	TCAACCCCCAGCATTGAC	591
Exon 3	CCTTTCCAGATGGA ACTCA	CCAAAGCCCCCTTATGATGAA	495
Exon 4	AGCCCAGATTCTGGGTATT	AACCCAGCAAATTTCTCAGC	443
Exon 5	TTGACCTGGTGTCTGGTCTGT	GAGCATACATGGCATTGGA	513
Exon 6	GCAAGACCCCGTCTCTACAA	GGAGGACAATGGGCCTAGA	646
Promoteur	TGGTGAAACCCCGTCTCTAC	TGCGCCAATGATTCACCTC	503
Promoteur	CTGGAATGCAGTCTCCTGGT	ACATGTGTTTTCAACCAGCA	623
Promoteur	GACACCGGGTGAATGCATAG	AGGCTGGCTGGTGTGTGT	587
Promoteur	GTGTTTCCTGACGGTTTCCA	ACTGGGGAAGTTTCTCAGGA	434
Promoteur	CCCCAAGCTCCAGATCCT	GACACCGACACCACACCAC	486
<b>DGAT2</b>			
Exon 1	AGCTCCAGGTGCCTAGCC	CTTCTCGCAGGTCCATAACC	308
Exon 2	GGAGAGAAGGGTGACAGTGG	CTCTTTTGGGGAAGTGGACA	232
Exon 3	AAGCCCAGTAGGACCTGACC	GGGGAAGAGCATCCCTAGAA	201
Exon 4	AACTGGCCCTGTCTTGCT	TCAGATTTCCCATCCATTCC	199
Exon 5	GTATCCCTCTCCAGCCAGT	ACTCCCTCAACACAGGCATT	238
Exon 6	ATGGGCAACCCTGACTGTT	GGGGTGTGTGTGTGTAGG	245
Exon 7	GGGCCTCTAGGCTGACATAG	GTTCAGGACAGCCCTTGGT	312
Exon 8	CAGGGGAAAGGGGTGTTGACTA	GTGATTTGCAGCTGGTTCCT	249

**Tableau IV. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification de tous les exons de gènes spécifiques et du promoteur de SCD-1**

## 5.7 Séquençage

Un aliquote des réactions de PCR a été soumis à une électrophorèse (40 minutes à 80 volts) sur gel d'agarose à 2% contenant 0.08µg/ml de bromure d'éthidium. Les bandes d'intérêts ont été visualisées et excisées sous UV. L'ADN a été purifié avec le protocole de QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). La quantité d'ADN présente dans chaque bande a été mesurée à l'aide d'une courbe de calibration utilisant 25 ng/µl de pBr 322 digéré avec MspI. Une quantité croissante de ce standard est déposée sur le gel. Le fragment de 0.622 Kb est utilisé pour fin de calcul. L'analyse quantitative des bandes visualisées a été faite par densitométrie (AlphaEase). A l'aide du tableau de taille des fragments (fourni par le service de séquençage), nous avons calculé le volume contenant la quantité nécessaire pour obtenir une concentration de 500 fmoles/15µl de tampon EB (de la trousse QIAquick). L'ADN a été séquencé sur un appareil Beckman et les séquences analysées avec le logiciel Sequencher 4.1.4.

## 5.8 Extraction d'ARN et Transcription Inverse

L'ARN total des kératinocytes a été isolé avec le Trizol® selon la méthode du manufacturier. Les culots d'ARN ont été laissés à sécher à l'air pendant quelques minutes, resuspendus dans 40 µl d'eau DEPC (Proméga) et incubés à 65°C pendant 5 minutes afin de bien dissoudre l'ARN.

La concentration en ARN a été mesurée par spectrophotométrie à 260λ. La qualité de l'ARN a été vérifiée en calculant le ratio 260λ/280λ. Les échantillons d'ARN ont été conservés à -70°C. 600 ng d'ARN ont été rétrotranscrits de la façon suivante: les échantillons ont été mis à incuber à 65°C pendant 10 minutes. 10.5 µL de la solution RT Omniscript Kit (Qiagen) ont été ajoutés à chaque tube. Les tubes ont été incubés à 42°C pendant 60 minutes, puis de 5

minutes à 95°C pour être finalement refroidis à 4°C. Les échantillons ont été gardés à -20°C.

## 5.9 Q-PCR

Les conditions idéales pour chaque paire d'amorces ont été établies en faisant une courbe de quantification. Des dilutions croissantes d'ADN (1-1/15,000, dans un volume final de 25µl) ont été soumises à 2 amplifications de PCR : une pour S14, une protéine ribosomale qui sert de contrôle interne, et une autre pour le gène d'intérêt, chacune en triplicata. Les quantités d'amorces et les conditions de PCR donnant un doublage de la quantité d'ADN par cycle d'amplification ont été retenues et peuvent varier légèrement pour chaque gène. Le PCR en temps réel a été fait avec un appareil MX4000 ou MX3500 (Stratagene) en utilisant le mastermix de SYBER Green acheté de Qiagen. Le programme de PCR a comporté une étape d'activation de polymérase (15 minutes à 95°C) suivie de 40 cycles de 30 secondes à 94°C, de 30 secondes à 58°C et de 30 secondes à 72°C. Les résultats ont été analysés avec le logiciel MX3500. Toutes les amorces ont été conçues en utilisant le logiciel Primer 3 et ont été commandées chez Invitrogen (Burlington, Ontario). Afin d'éviter l'interférence de l'ADN génomique souvent présent dans les préparations d'ARN, les amorces ont été conçues pour comprendre la jonction de deux exons (tableau V).

Gene	5'-oligo	3'-oligo
CGI-58	GACTCTTTTCACCTCCCAG	CGGCTGTTACCTCTCT
K10	AAAATCAGATTCTCAACAACAGA	GCAGAGCTACCTCATTCTCATAC
PPAR $\beta$	AAGAGGAGGAGAAAGAGGAAG	AGTTGGTCCAGCAGTGAG
PPAR $\alpha$	CACAACCAGCACCATCTGGT	AGAACTATCCTCGCCGATGGA
LDL-R	AGGAGACGTGCTTGTCTGTC	CTGAGCCGTTGTCTGCAGT
SCD1	CCCCTACGGCTCTTTCTGAT	GCGTACTCCCCTTCTCTTTG
ApoC1	CTTGGAAGGCCAGCCC	ATCTTGAGTTTCTCCTTCACTTTCTG
S14	GGCAGACCGAGATGAATCCTCA	CAGGTCCAGGGGTCTTGGTCC
ApoE	CCCGGCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTTT	GGGGGATCCTCGCGGGCCCCGGCCTGGTACA

**Tableau V. Séquence des oligonucléotides utilisés pour l'amplification des gènes analysés par PCR quantitatif**

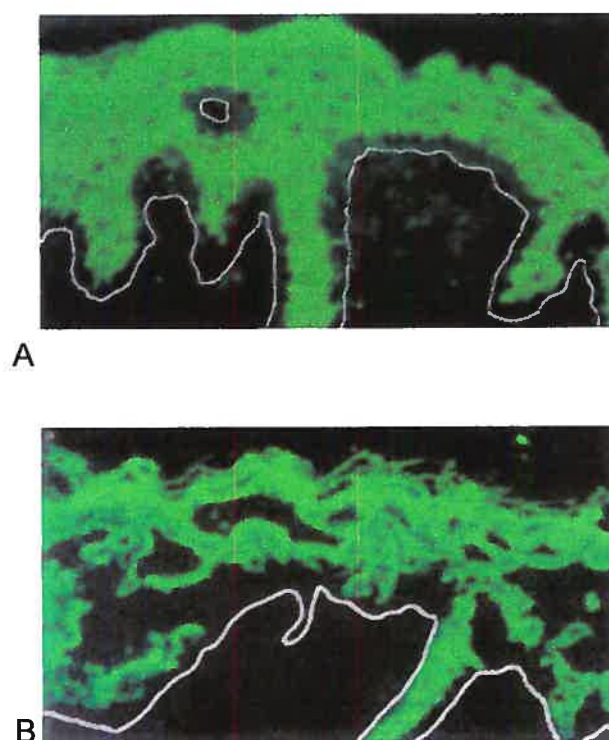
### 5.10 Extraction et analyse des lipides de la peau

Les lipides de la peau ont été recueillis avec les bandes adhésives SEBUTAPE® (Cuderm corp. Dallas, TX). La peau a été nettoyée des débris par lavage avec de l'eau et du savon et les bandes ont été maintenues sur le front pendant 3 heures. Les lipides ont été extraits de la façon suivante : les bandes ont été placées dans des tubes en verre pré-traités avec une solution de Folch, 2 ml d'hexane ont été ajoutés et les tubes ont été placés pendant 5 minutes à la température ambiante dans un sonicateur Branson. Le contenu des tubes a été transféré dans un deuxième tube. 2 ml d'hexane ont été ajoutés au premier tube suivi d'une agitation vigoureuse. Le solvant résultant a été séché sous un jet d'azote. Les échantillons secs ont été conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  avant d'être envoyés chez le Dr James Ntambi à l'Université de Wisconsin-Madison. Des lipides totaux extraits à partir des bandes adhésives ont été séparés par la chromatographie sur le gel de silice (chromatographie sur couche mince). Les acides hexane/ éther/ acétique (70:30:1) ont été utilisés en tant que dissolvant et ultérieurement les lipides ont été visualisés sous une lampe UV après avoir été pulvérisé avec une solution de primuline (5 mg en 100 ml d'acétone - eau 80/20).

## 6. RÉSULTATS

### 6.1 Analyse des biopsies cutanées et des peaux reconstituées

La figure 7 montre le marquage des biopsies de la peau d'un contrôle (A) et de JB (B) in situ. Un anticorps fluorescent contre la kératine 10, un marqueur précoce de différenciation épidermique, a été utilisé pour le marquage des cellules.

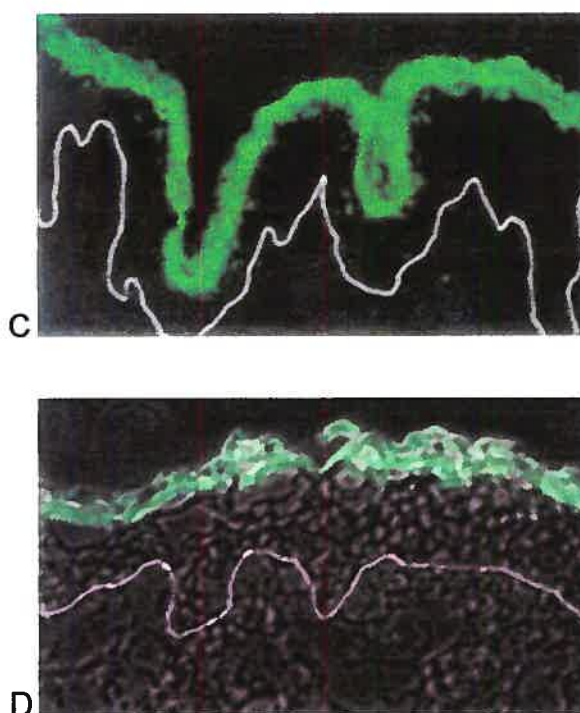


**Fig. 7 Immunomarkage de la kératine 10** d'une biopsie cutanée de peau normale humaine (A) et d'une de nos patientes JB (B)

Chez JB, on remarque l'apparence désorganisée de la peau passant d'un épiderme très mince à plus épais. On observe aussi la présence de trous au niveau de l'épiderme. Certaines régions semblent plus affectées et démontrent une pluristratification anormale (cellules aplaties même dans la couche basale,

perte de la cohésion entre les cellules). K10 caractéristique de l'épiderme, est exprimée en quittant le compartiment basal, quant les cellules diminuent leur expression de K5-K14 et induisent le processus de la différenciation cellulaire. Il est à noter que la kératine 10 chez nos patientes est présente dans les premières couches suprabasales

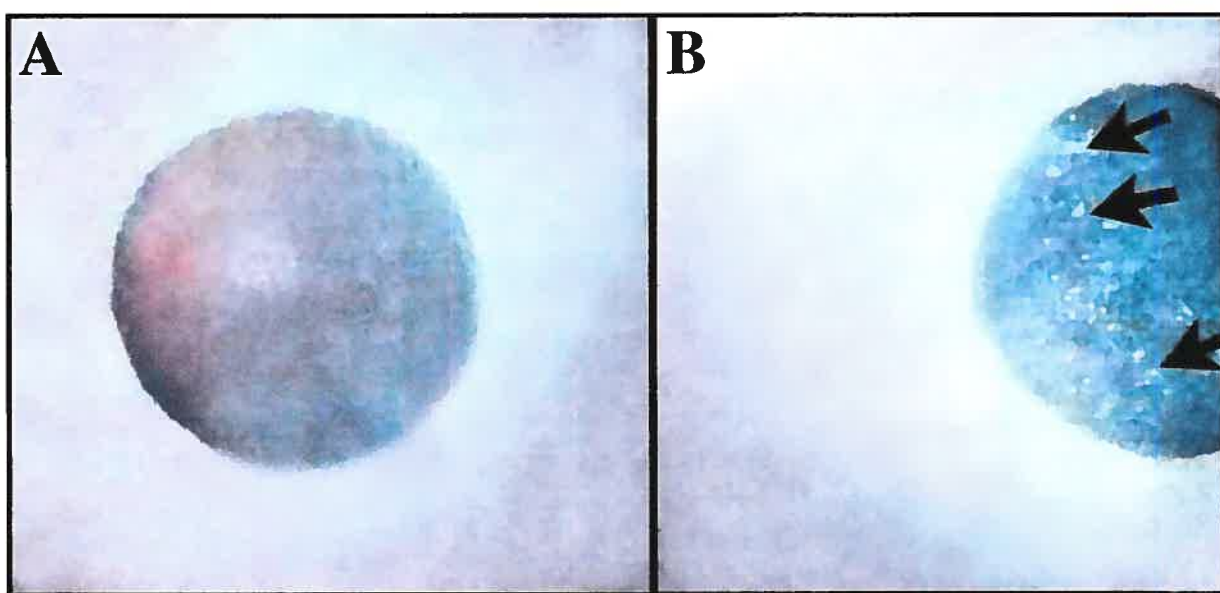
Un anticorps fluorescent contre la filaggrine, (figure 8 C et D) qui est un marqueur tardif de la différenciation épidermique, a permis de montrer chez les patientes que cette protéine apparaît plus tardivement, dans les dernières couches suprabasales des épidermes.



**Fig. 8 Immunomarquage de la filaggrine** sur une biopsie cutanée de peau normale humaine (C) et de JB (D)

## 6.2 Analyse histologique des peaux reconstruites

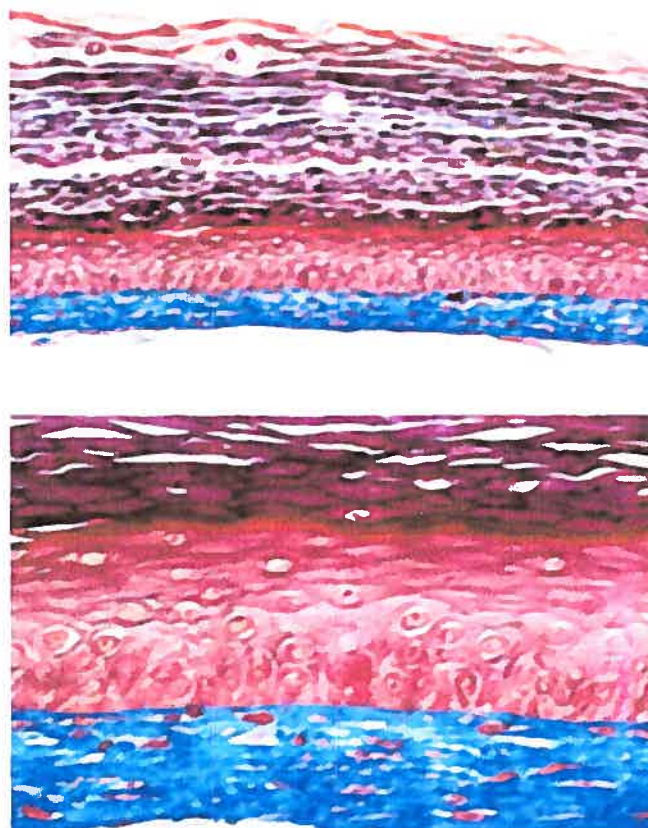
Les peaux reconstruites (figure 9) à partir des kératinocytes de JB (B) présentent un aspect macroscopique plus épais et plus granuleux que les peaux reconstruites à partir de kératinocytes normaux (A).



**Fig. 9 Aspect macroscopique des peaux reconstruites** à partir des kératinocytes de nouveau-né (A) et à partir des kératinocytes de JB (B)

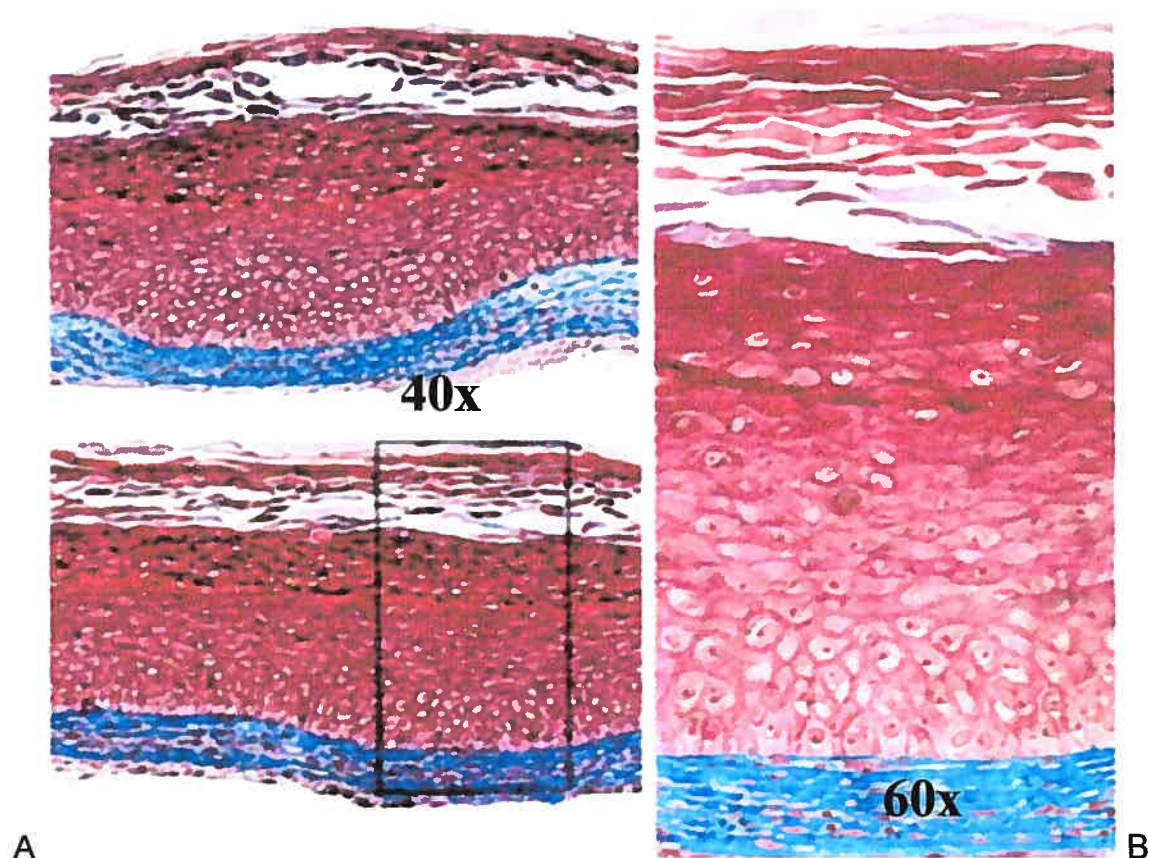
On y dénote aussi la présence de domaines de prolifération visibles à l'oeil nu (flèches).

Les coupes histologiques des peaux reconstruites montrent un épaissement de l'épiderme (figure 10 et 11) et par endroit, des domaines de prolifération présentant un très grand nombre de couches cellulaires comparativement aux peaux reconstruites chez le contrôle.



**Fig. 10 Coupes histologiques des peaux reconstruites à partir de kératinocytes d'un contrôle. Colorant : Masson trichrome. Amplification : 40X**





**Fig.11 Coupes histologiques des peaux reconstruites chez JB. B :** grossissement 60X de la région encadrée en A. Coloration : Masson trichrome

Il est très intéressant de noter la présence de noyaux dans les cellules de la couche cornée. Dans les peaux normales, les noyaux ne sont jamais présents dans la couche cornée. Leur présence dans les couches externes de l'épiderme, ainsi que l'épaisseur plus grande de la couche basale, suggèrent fortement un déséquilibre entre prolifération et différenciation.

La K 10, qui est un marqueur de différenciation précoce et qui apparaît dès les premières couches suprabasales de l'épiderme, a été retrouvée dans toutes les peaux reconstruites et aucun défaut dans l'organisation de celle-ci n'a été détecté.

Cependant, la filaggrine, qui apparaît environ au niveau des 5-6ième couches dans les peaux reconstruites à partir de cellules normales (63) semble apparaître plus tardivement, 10-15ième couches, dans les domaines de prolifération des peaux reconstruites à partir des cellules JB.

Ces résultats suggèrent que les premières étapes de la différenciation sont induites, comme l'expression de la K 10, mais avec un retard au niveau de la différenciation des peaux reconstruites faites à partir des kératinocytes JB (poursuite de la prolifération, présence de noyaux dans la couche cornée et retard de l'apparition des marqueurs tardifs).

Il est à noter qu'aucune anomalie des cellules de la lignée LB, qui pourtant est également atteinte par la maladie, n'a été observée. Cependant, la peau reconstruite provenait d'une biopsie d'une zone non atteinte de la patiente, les kératinocytes obtenus à partir de biopsie de la zone atteinte n'ayant pas poussé suffisamment.

### **6.3 Analyse de marqueurs de différenciation chez les kératinocytes en culture primaire**

La régulation adéquate de la différenciation est très importante pour le maintien d'une peau fonctionnelle. La balance entre la prolifération et la différenciation terminale est régulée de façon complexe.

Lors de la différenciation des kératinocytes, certaines protéines sont exprimées de façon séquentielle (64). Après avoir atteint la confluence, les kératinocytes

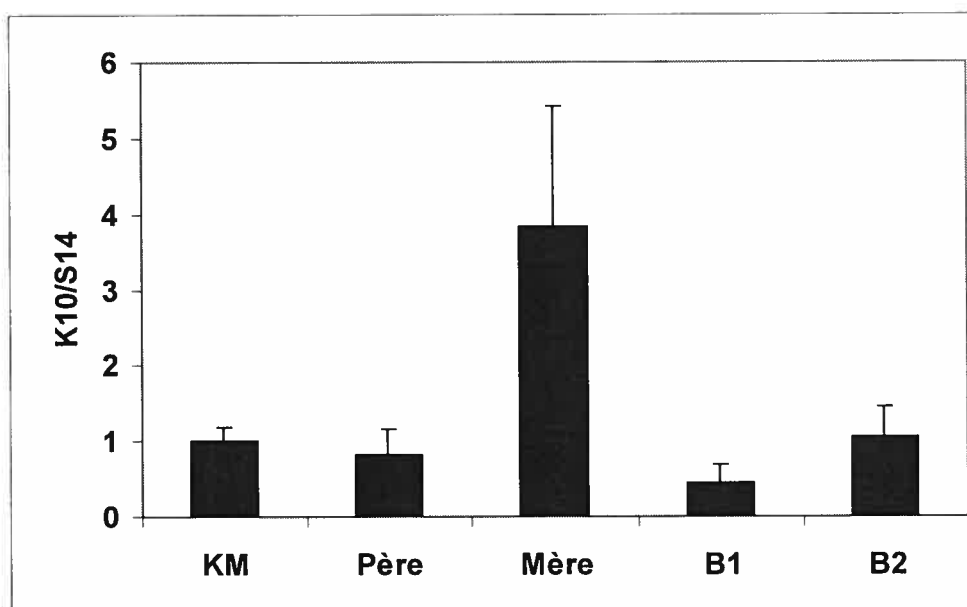
cessent de se diviser et commencent à se différencier (65). Ils commencent alors à exprimer certaines protéines spécifiques comme l'apoC1 et l'estérase/thiolase/lipase à l'identité mal connue codée par le gène CGI58, tandis que d'autres protéines comme le LDL-R cessent d'être exprimées.

L'expression de l'ARNm de différentes protéines a été étudiée lors de la différenciation in vitro de kératinocytes en culture primaire. En culture monocouche, les kératinocytes non différenciés se multiplient rapidement. Dès que la culture atteint le stage de confluence, les cellules cessent de se diviser et mettent en marche le programme de différenciation. Les cellules ont été analysées à deux phases : 50-75% confluentes (cellules non-différenciées) et 2 jours après confluence (cellules en état de différenciation).

Il est à noter qu'en culture monocouche, les cellules n'atteignent pas le stade terminal de différenciation.

## 6.4 Expression de la kératine 10

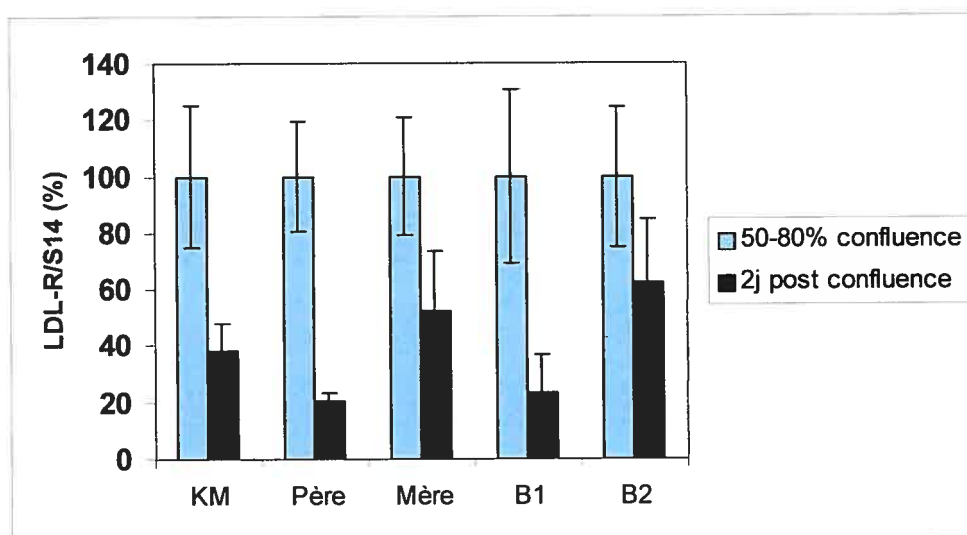
La kératine 10 est un marqueur qui apparaît très tôt lors de la différenciation, même en culture (66). Comme on peut voir sur la figure 12, la kératine 10 qui n'est pas décelable dans les cellules pré-confluentes, est exprimée abondamment 2 jours après confluence, signe que les kératinocytes ont mis en marche le programme de différenciation. Les temps choisis sont donc représentatifs pour l'étude de l'expression de certains gènes.



**Fig. 12 Expression de l'ARNm de la K 10** chez les kératinocytes en culture, deux jours après la confluence. Les valeurs représentent le ratio de l'ARN de K10 relatif à l'ARN de S14. Les barres d'erreur représentent la déviation standard de 3 réactions RT-PCR. B1 représente l'expression de l'ARNm de la K10 chez les kératinocytes de LB, peau saine et B2 représente l'expression de l'ARNm de la K10 chez les kératinocytes de JB, peau atteinte.

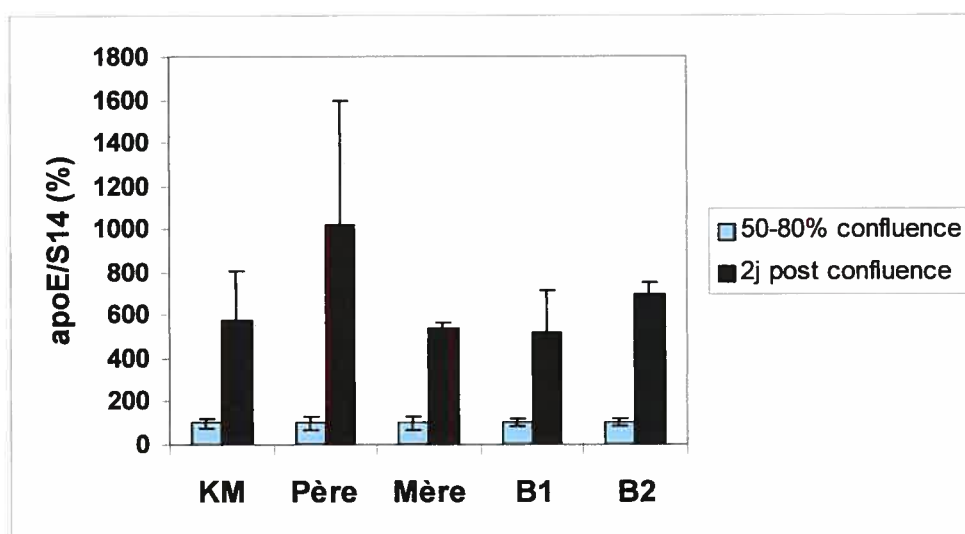
## 6.5 Expression du LDL-R, de l'apoE et de l'apoC1

Des études ont démontré que le métabolisme du cholestérol était important pour le maintien de l'intégrité de la barrière épidermique. Le récepteur LDL est abondant dans les cellules progénitrices mais disparaît avec la différenciation en kératinocytes (67). Comme on peut voir dans la figure 13, aucune différence dans l'expression du LDL-R n'a été observée entre les cellules des patientes et les cellules témoins.



**Fig. 13. Expression de l'ARNm du récepteur LDL.** L'expression est relative à l'expression mesurée avant la confluence. Les barres d'erreur représentent la déviation standard de 3 réactions PCR. B1 représente l'expression de l'ARNm du récepteur LDL dans les kératinocytes de LB, peau saine et B2 représente l'expression du récepteur LDL dans les kératinocytes de JB, peau atteinte.

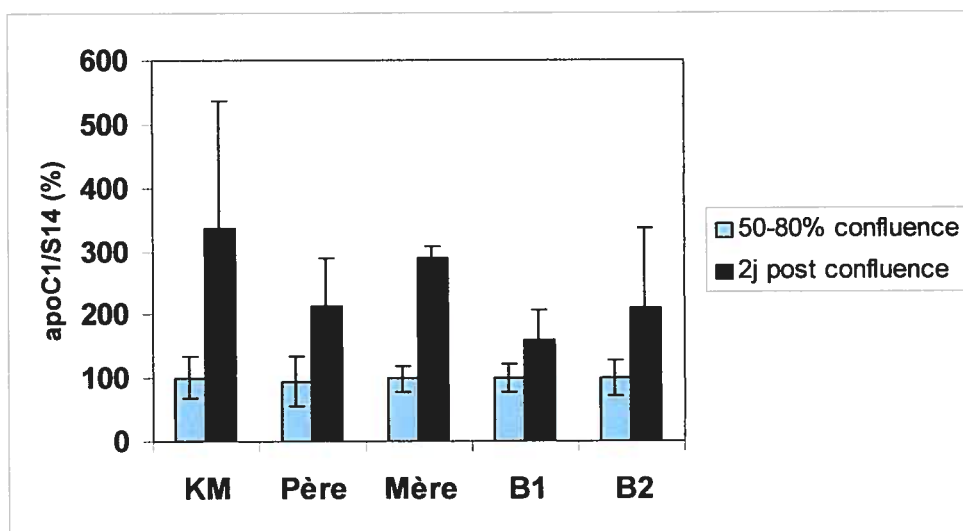
La présence de l'apoE et de l'apoC1 dans la peau a été démontrée et les kératinocytes en culture sécrètent de l'apoE (68), (fig. 14). L'expression de l'apoE augmente quand il y a perturbation de la barrière de perméabilité.



**Fig. 14 Expression de l'ARNm de l'apoE.** L'expression est relative à l'expression mesurée avant la confluence. Les barres d'erreur représentent la déviation standard de 3 réactions PCR. B1 représente l'expression de l'ARNm de l'apoE chez les kératinocytes de LB, peau saine et B2 représente l'expression de l'ARNm de l'apoE chez les kératinocytes de JB, peau atteinte.

Les souris transgéniques qui surexpriment l'apolipoprotéine C1 ont les glandes sébacées hypoplasiques, une hyperplasie épidermique, de l'alopecie et sont hypertriglycéridémiques (69).

Chez l'humain on ne sait rien de l'expression ou la sécrétion de l'apoC1 par les kératinocytes. La figure 14 montre l'expression de l'ARNm de l'apoE avant et après la différenciation. La figure 15 montre l'expression de l'apoC1. Aucune différence n'a été démontrée entre les cellules normales et les cellules des patientes.

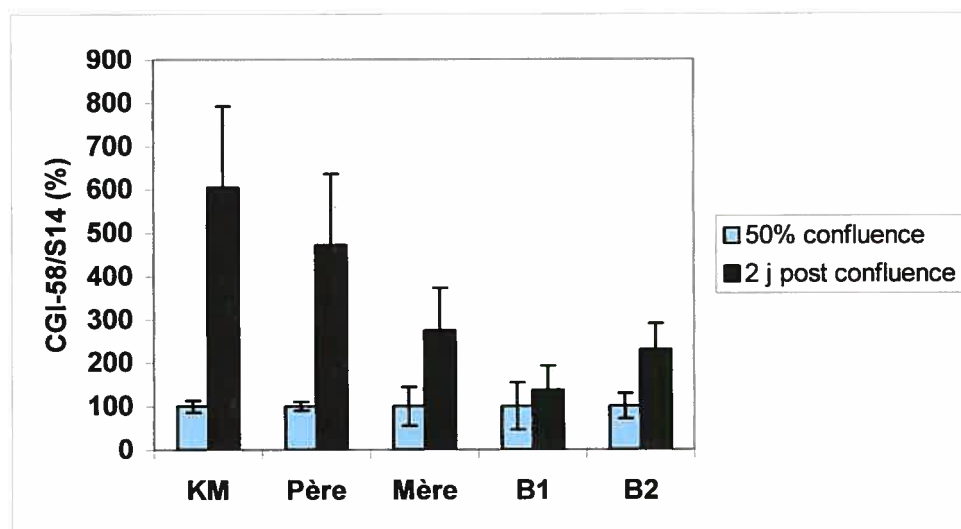


**Fig.15 Expression de l'ARNm de l'apoC1.** L'expression est relative à l'expression mesurée avant la confluence. Les barres d'erreur représentent la déviation standard de 3 réactions PCR. B1 représente l'expression de l'ARNm de l'apoC1 chez les kératinocytes de LB, peau saine et B2 représente l'expression de l'ARNm de l'apoC1 chez les kératinocytes de JB, peau atteinte.

## 6.6 L'expression de CGI-58

CGI-58 est le gène dont les mutations sont responsables du syndrome de Chanarin-Dorfman (70). L'expression de ce gène dans les kératinocytes en culture primaire n'a fait l'objet d'aucune étude jusqu'à présent. Il était donc intéressant de voir si l'expression de ce gène variait avec la différenciation.

Comme on peut voir dans la figure 16 l'expression de CGI-58 augmente quand les cellules se différencient. L'augmentation avec la différenciation est beaucoup moins prononcée chez les patientes.



**Fig.16 Expression de l'ARNm de CGI-58.** L'expression est relative à l'expression mesurée avant la confluence. Les barres d'erreur représentent la déviation standard de 3 réactions PCR. B1 représente l'expression de l'ARNm de CGI-58 chez les kératinocytes de LB, peau saine et B2 représente l'expression de l'ARNm de CGI-58 chez les kératinocytes de JB, peau atteinte.

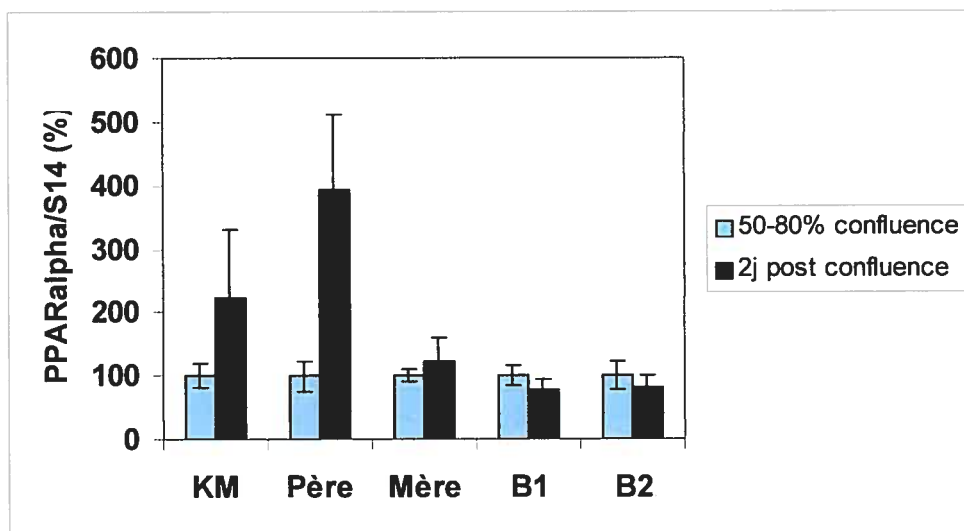


## 6.7 Expression des PPARs

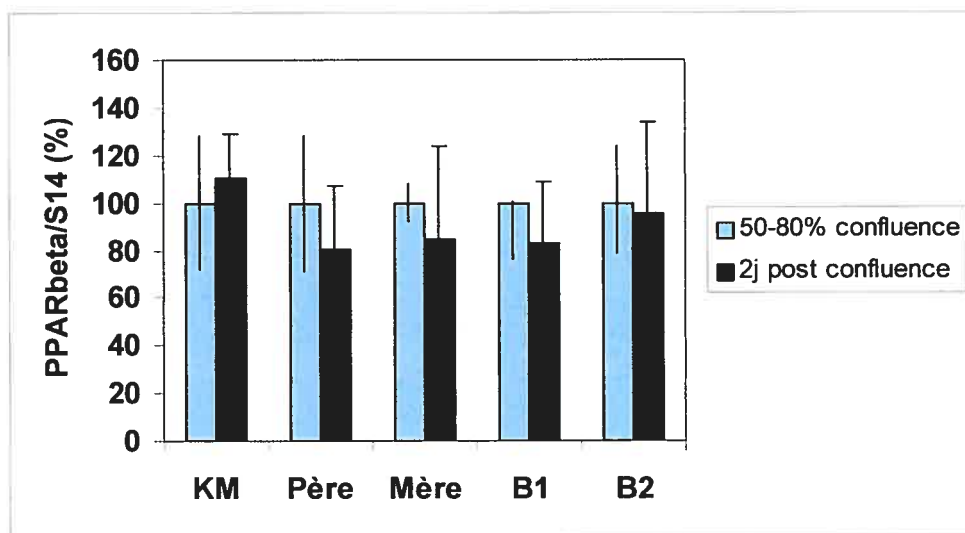
Les PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires activés par les lipides, et sont très importants dans le contrôle de la différenciation et de la prolifération cellulaire et du développement. Trois types de PPAR, dénommés alpha, delta (également appelé beta) et gamma ont été décrits. Ils sont codés par des gènes distincts et caractérisés par des distributions tissulaires différentes.

Les études *in vitro* utilisant les agonistes spécifiques des PPARs suggèrent en effet une contribution importante de PPAR  $\alpha$  dans la formation de la barrière épidermique et dans la différenciation des sébocytes (71).

Le niveau d'expression des PPAR $\beta$  est très élevé chez les kératinocytes mais ne change pas avec l'état de différenciation des cellules. Les niveaux d'expression des PPAR $\alpha$  et  $\gamma$  au contraire varient avec l'état de différenciation des cellules. La figure 17 et 18 montre l'expression de PPAR $\alpha$  et PPAR $\beta$ .



**Fig. 17 Expression de l'ARNm de PPAR $\alpha$ .** L'expression est relative à l'expression mesurée avant la confluence. Les barres d'erreur représentent la déviation standard de 3 réactions PCR. B1 représente l'expression de l'ARNm de PPAR $\alpha$  chez les kératinocytes de LB, peau saine et B2 représente l'expression de l'ARNm de PPAR $\alpha$  chez les kératinocytes de JB, peau atteinte.



**Fig. 18 Expression de l'ARNm de PPAR $\beta$ .** L'expression est relative à l'expression mesurée avant la confluence. Les barres d'erreur représentent la déviation standard de 3 réactions PCR. B1 représente l'expression de l'ARNm de PPAR $\beta$  chez les kératinocytes de LB, peau saine et B2 représente l'expression de l'ARNm de PPAR $\beta$  chez les kératinocytes de JB, peau atteinte.

Comme on voit sur la fig. 17 l'expression de PPAR $\alpha$  mesuré par RT-PCR n'augmente pas chez les patientes. En effet, nos résultats suggèrent fortement que cet effet des activateurs de PPAR $\alpha$  exprime une différenciation épidermique incomplète chez les patientes. Les niveaux de PPAR $\gamma$  dans les cultures étaient trop bas pour être analysés.

## 6.8 Séquençage de la kératine 10, la transglutaminase-1 et de la CGI-58

Les ichtyoses sont des dermatoses héréditaires rares, dues à un trouble de la kératinisation (72), se caractérisant par une sécheresse de la peau et une desquamation. Plusieurs anomalies génétiques y sont associées. Le déficit en transglutaminase kératinocytaire (TGK) est le plus fréquent (73). La kératine 10 est aussi impliquée dans certaines formes d'ichtyose et la CGI-58 est responsable du syndrome de Chanarin-Dorfman (74). Les gènes TGK, K10 et CGI-58 ont été séquencés chez les patientes. Aucune mutation n'a été mise en évidence.

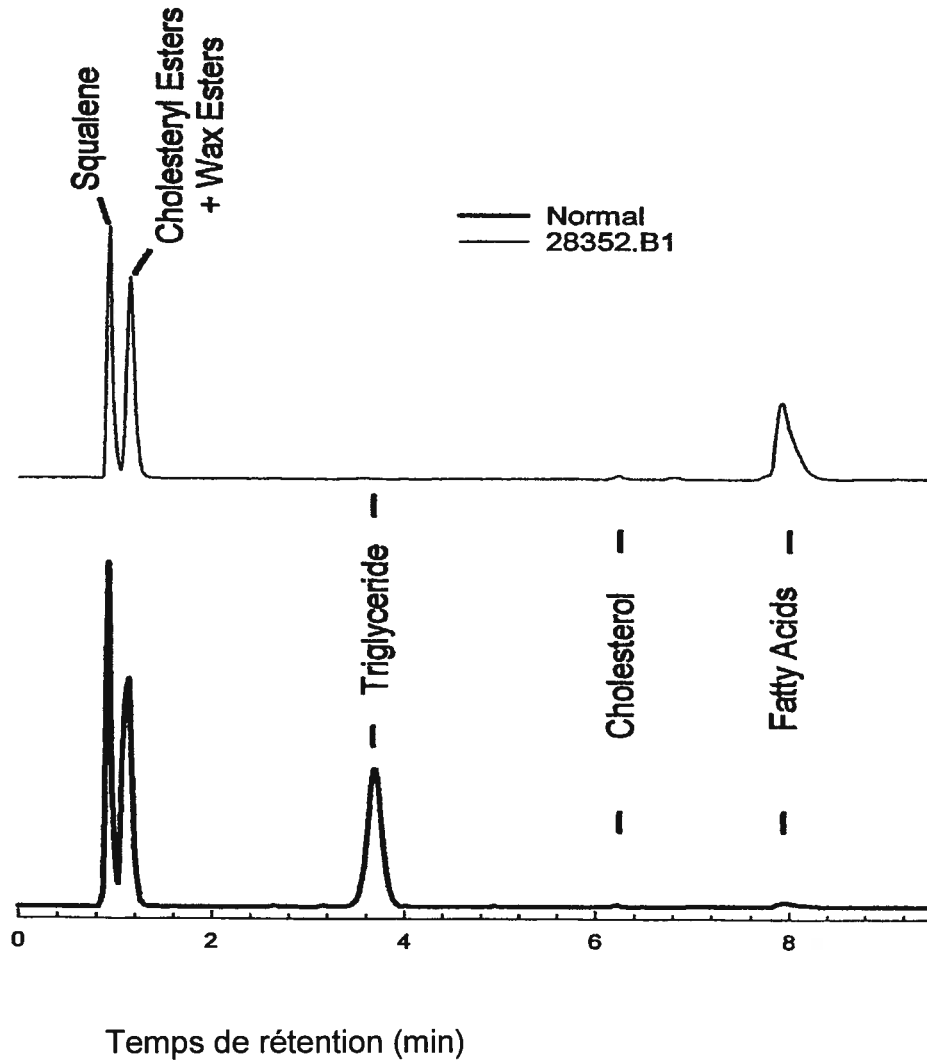
## 6.9 Expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides de la peau

L'analyse de sécrétion des lipides à partir de la peau a montré l'absence de triglycérides et un excès des acides gras (figure 19). Ces résultats suggèrent un défaut possible dans une ou plusieurs enzymes importantes pour la synthèse des triglycérides et des acides gras.

Par contre, leur profil lipidique plasmatique est pratiquement identique, avec des niveaux bas de cholestérol, de LDL, d'apoB et de rétinol, rappelant le profil des patients avec hypobetalipoproteinémie. Les dosages des acides gras à très longue chaîne n'ont pas montré d'anomalies significatives.

mmol/L	N	J.B	L.B	Le père	La mère
Cholesterol	<5.20	3.42	3.35	5.43	5.18
Triglycerides	<2.30	1.08	0.57	1.22	2.43
LDL-C	<4.16	1.60	1.78	3.61	2.97
HDL-C	>0.95	1.29	1.46	1.40	1.48
Total apo B (mg/dL)	80-130	48	46	98	101
Retinol	530	257	274	374	581

**Tableau VI Bilan lipidique plasmatique.** N représente les valeurs normales



**Fig. 19 Analyse des lipides de la peau faite par HPLC.**

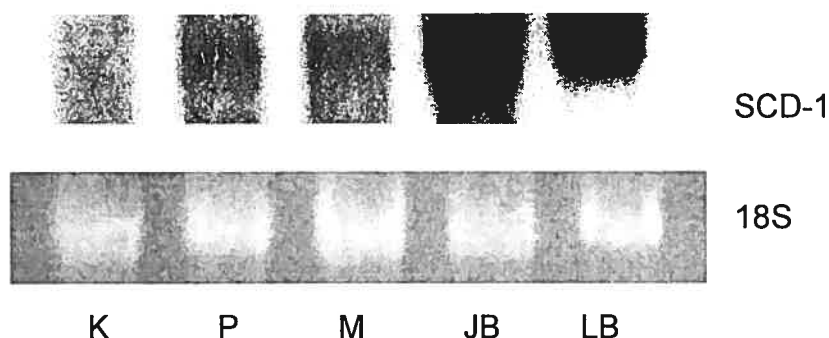
Deux gènes récemment identifiés codant pour la stéaroyl CoA désaturase (SCD-1) et l'acyl-CoA :diacylglycérol acyl-transferase-2 (DGAT2) sont nécessaires pour la synthèse des lipides de la peau. Des mutations ou encore la suppression de l'expression de ces gènes chez la souris entraîne des désordres de la peau.

Il existe un modèle de souris montrant un phénotype semblable à celui de nos patientes, la souris scraggly développée par Lorraine Flaherty (75). Cette souris a une peau et des larmes huileuses, une perte de poils, et des esters de

cholestérol réduits dans la peau. Le souris scraggly présent une mutation dans la gène codant pour l'enzyme Elovl 3, sur le chromosome 19. La souris asebia par contre présente le phénotype opposé : alopecie qui progresse à la perte presque complète des poils, inflammation périfolliculaire, des glandes sébacées hypoplasique et une production de sébum minimale. La souris asebia porte une mutation spontanée dans le gène codant pour l'enzyme SCD-1. Elle est comparable à une souris SCD-1-/- (76).

La SCD-1 est une enzyme catalysant l'étape finale dans la synthèse cellulaire des acides gras insaturés, principalement de l'oléate et du palmitoléate à partir du stéaroyl- et du palmitoyl-CoA respectivement (77). L'oléate et le palmitoléate sont les principaux acides gras insaturés des phospholipides des membranes, des esters de cholestérol et des triglycérides. Plusieurs isoformes du gène de SCD (SCD-1, SCD-2, SCD-3, et SCD-4) existent chez les souris, et deux ont été caractérisés chez l'homme. L'expression du gène SCD-1 dans les cellules de foie est régulée par de nombreux stimuli comprenant le régime alimentaire et les hormones (78).

L'expression de la SCD-1 a été mesurée par Northern Blot. Une surexpression de cette enzyme a été démontrée chez les patientes et leurs parents comparativement à des cellules contrôles (fig. 20).



**Fig. 20 Northern blot de l'ARN de SCD-1.** Le 18S est utilise comme contrôle interne.

Cette surexpression a été confirmée par RT-PCR chez JB.

La surexpression de l'ARN de SCD-1 suggère une activité accrue de l'enzyme. Cependant, la séquence des 6 exons et de 2600 nt du promoteur du gène SCD-1 n'a révélé aucune mutation.

Chez l'humain la désaturation consiste à insérer une double liaison entre les carbones 9 et 10 de l'acide stéarique (18:0) pour former l'acide oléique (18:1 $\Delta$ 9).

Pour vérifier si cette surexpression avait des conséquences fonctionnelles, le ratio d'acide gras n16:0/n16:1 et n18:0/n18:1 dans les lipides de la peau a été analysé par le laboratoire du Dr J. Ntambi (tableau VI).

		Fatty acid composition (%)									
		14:0	16:0	16:1 (n10)	16:1 (n7)	18:0	18:1 (n9)	18:1 (n7)	18:2	18:3 (n3)	20:0
Total	Control	18.56	33.31	36.27	-	1.96	7.54	1.24	0.07	0.91	0.14
	Patient	21.41	31.31	35.46	-	1.65	8.25	1.12	0.06	0.64	0.10
FFA	Control	17.61	39.66	27.28	-	5.09	8.96	0.99	-	-	0.21
	Patient	21.14	35.55	29.19	-	3.16	9.73	1.09	-	-	0.15
TG	Control	18.01	40.51	24.06	-	4.7	11.42	1.06	-	-	0.24
	Patient	19.30	37.04	27.50	-	4.57	10.21	1.20	-	-	0.19
PL	Control	11.96	39.60	8.92	8.05	28.28	3.19	-	-	-	-
	Patient	12.72	34.75	11.19	12.18	21.71	7.45	-	-	-	-

**Tableau VII Variation en quantité et en composition des lipides cutanés**

Le ratio 16:1/16:0 et 18:1/18:0 dans les différentes fractions est plus élevé chez les patientes que chez les contrôles. Cela est plus marqué dans la fraction des acides gras (FFA) et des phospholipides (PL). Ces résultats suggèrent une activité enzymatique plus grande de la SCD-1 chez les patientes et confirment les résultats obtenus par Northern blot.

DGAT2 est responsable de la majorité de la synthèse de triglycéride chez les souris. Dans les expériences sur des souris, les résultats ont prouvé que

DGAT2 joue un rôle comparativement plus grand dans la synthèse et le stockage de triglycéride et que l'insuffisance en DGAT2 est incompatible avec la survie (79). Les souris manquant de DGAT2 sont lipopéniques, avec un contenu sévèrement réduit des triglycérides dans leurs tissus.

Les souris DGAT2  $-/-$  montrent une absence totale de triglycérides dans tous les tissus. Des anomalies graves de la peau contribuent à la létalité postnatale. La peau a un aspect anormal et la barrière de perméabilité est défectueuse. En conséquence, les souris deviennent rapidement déshydratées, ce qui contribue probablement à leur décès. La barrière cutanée défectueuse chez les souris DGAT2  $-/-$  était inattendue, et son étiologie est incomplètement comprise. Ce problème est probablement relié aux changements du métabolisme des lipides de la peau (80). Certains aspects du phénotype de la peau des souris DGAT2  $-/-$  ressemblent à ceux observés dans l'insuffisance en acide gras essentiels (81).

En outre, l'acide linoléique est un composant de l'acylcéramide, un lipide impliqué dans la fonction de la barrière épidermique de perméabilité. L'analyse de la composition en acides gras des triglycérides du foie et de la peau a indiqué qu'il n'y avait presque aucun acide gras essentiel dans les triglycérides des souris DGAT2  $-/-$ . Puisque DGAT2 est exprimé dans l'épiderme néonatal, l'anomalie de barrière pourrait être due à l'absence de DGAT2 dans ce tissu (82). Cependant, les études de transplantation de peau suggèrent que l'anomalie de barrière est reliée au manque systémique de DGAT2, plutôt qu'à l'insuffisance de DGAT2 dans l'épiderme. Une explication alternative est que DGAT2 exprimé dans d'autres tissus peut mettre des lipides en circulation qui corrigent les défauts fonctionnels et structuraux épidermiques (83). Puisque le modèle d'expression de tissu de DGAT2 chez les souris est semblable à celui observé chez l'homme, il est probable que DGAT2 joue un rôle également dans le métabolisme des triglycérides chez l'homme (84).



Nous avons séquencé le gène de la DGAT2 et aucune mutation n'a été identifiée.

### **6.10 Mélanocortine**

Les souris chez qui le récepteur melanocortin-5 est absent ont une production réduite de sébum. La mélanocortine joue un rôle dans la régulation des comportements alimentaires, le poids corporel, la pigmentation et les fonctions immunitaires. Le récepteur melanocortin-5 a été décelé dans la peau normale et dans les kératinocytes cultivés mais pas dans les mélanocytes ou les fibroblastes. Aucune preuve à l'appui d'un rôle étiologique du récepteur melanocortin-5 dans les dysfonctions des glandes sébacées et aucune association entre les variations génétiques du récepteur melanocortin-5 et les diverses maladies de la peau chez l'humain n'ont été rapportées (85). Là encore, le séquençage de MR-5 n'a révélé aucune mutation.

## DISCUSSION

Cette étude porte sur deux jumelles monozygotiques (JB et LB) présentant un phénotype inhabituel d'ichtyose huileuse, maladie qui a débuté à l'âge adulte. LB est nettement moins atteinte (environ 10% de surface corporelle atteinte) que sa sœur JB (environ 30 % de surface corporelle atteinte), mais chez les deux jumelles les premiers symptômes se sont manifestés vers l'âge de 15 (LB) et 26 (JB) ans et ont été très discrets au début. Il s'agissait d'une perte de cheveux et d'une peau grasseuse avec lésions d'hyperkératose, surtout au niveau de cuir chevelu chez LB, et d'un problème d'acné chez JB. Ces symptômes étaient accompagnés d'une sensation constante de brûlures superficielles au niveau de la peau, plus particulièrement de la figure, de la région cervicale et du haut du thorax. Cette symptomatologie a empiré un an plus tard chez JB à la suite d'un traitement pour acné à l'âge de 27 ans, qui a provoqué une sécrétion massive de sébum au niveau du visage et du cuir chevelu, ainsi qu'une alopécie. Les lésions d'hyperkératose grasseuse se sont étendues au niveau du cou, du thorax, des jambes, des bras et de l'abdomen sous forme de plaques orangées, surtout à la base des poils. Un fait particulier était la présence de larmes huileuses chez JB.

Au cours des dernières années sont apparus des symptômes générales comme : fatigabilité accrue, douleurs musculaire touchant plus particulièrement les extrémités, une perte de poids, un pouls plus rapide, des palpitations et la présence des anticorps anti-thyroïdiens élevés et une TSH à 0.03mUI/L, qui montre un tableau de la maladie de Graves auto-immunes. Le bilan lipidique montre des valeurs de LDL et d'apo B qui sont un peu réduits, rappelant le profil des patients avec hypobétalipoprotéinémie.

Ce tableau clinique et la présence des lésions à la base des poils et l'écoulement huileux suggèrent un problème au niveau des glandes sébacées.

Les biopsies cutanées ont démontré une hypertrophie marquée des glandes sébacées et une réaction inflammatoire lymphocytaire à la base des poils.

De plus, l'épaississement de la couche cornée montre une hyperkératose lamellaire non compacte marquée, accompagnée de la présence de petites vacuoles lipidiques au niveau de la couche basale épidermique et dans les leucocytes. Sur la base de ces résultats et de tableau clinique avec de squames grasses, on peut émettre un diagnostic présumptif de l'ichtyose huileuse qui ressemble au syndrome de Chanarin-Dorfman.

Décrit en 1974-1975, le syndrome de Chanarin-Dorfman, est une maladie dont le diagnostic est basé sur la présence de vacuoles lipidiques dans le cytoplasme des cellules polynucléaires circulantes, par l'ichtyose et la participation de plusieurs organes internes.

Il s'agit d'une affection rare (30 à 33 cas rapportés), mais ce nombre est certainement sous-estimé, puisque des frottis sanguins ne sont pas systématiquement réalisés dans toutes les érythrodermies congénitales ichtyosiformes sèches (EICS) (86).

L'expression clinique et/ou biologique du syndrome est généralement présente à la naissance mais peut être variable et peut se développer avec l'âge (87) (nos patientes étaient âgées de 28 et 16 ans à l'apparition des premiers symptômes). Le peu de familles rapportées rend difficile l'identification de marqueurs phénotypiques particuliers au syndrome et d'établir des relations génotype-phénotype.

Le séquençage du génome a permis de nombreux progrès. Lai et al. (88) ont identifié 150 protéines de *Caenorhabditis elegans* ayant des homologies avec des protéines humaines. Cette étude a permis d'identifier des mutations dans l'une de ces 150 protéines, CGI-58 (comparative gene identification), comme

causes du syndrome de Chanarin-Dorfman (89). La séquence de tous les 7 exons et d'une grande partie du 5' UTR de ce gène n'a révélé aucune mutation chez nos patientes. Malgré cela, l'expression de CGI-58 dans les kératinocytes en culture primaire montre une augmentation beaucoup moins prononcée pendant la différenciation cellulaire chez nos patientes. Il s'agit donc d'une maladie différente de celle rapportée par Lefèvre et al. D'autres gènes impliqués dans d'autres formes d'ichtyose, la kératine 10 et la transglutaminase-1 ne sont pas mutés chez nos patientes, ce qui permet d'éliminer l'ichtyose bulleuse. Des mesures de cholestéryl sulfate, faites dans notre laboratoire ont permis d'éliminer l'ichthyose reliée au chromosome X.

L'image d'une hypersécrétion huileuse avec une perte de poils et une production en excès d'esters de stérols fait penser à une surexpression du gène du récepteur MC-5. Chez les souris dont on a inactivé le gène du récepteur MC-5 pour MSH, les poils sont très secs et les souris restent mouillées plus longtemps lorsqu'on les met dans l'eau (90). Par ailleurs, des délétions randomisées de MC-5 produisent un phénotype différent ; la souris perd ses poils, les glandes sébacées produisent un excès d'esters de stérols et, en plus, on trouve des écoulements lacrymaux provenant des glandes de Meibomius (91). Ce phénotype, plus particulièrement l'excès de sécrétion des glandes sébacées et les écoulements lacrymaux, ressemble à celui de nos patientes. Il est à noter que les deux jumelles n'ont pas présentées la perte des poils axillaires ou pubiens. La possibilité de mutations dans le gène MC-5 a donc été vérifiée. Dans ce but nous avons amplifié et séquencé toute la région codante du récepteur MC-5 et aucune mutation n'a été trouvée.

Les analyses histologiques des biopsies et des peaux reconstituées ont mis à jour la présence d'un déséquilibre de la balance prolifération/différenciation au niveau de la peau. Dans les peaux reconstruites à partir des kératinocytes de JB, on observe en effet des domaines de prolifération où le nombre de couches cellulaires au niveau de l'épiderme est très important et dans lesquels

l'apparition des marqueurs tardifs de la différenciation (filaggrine) est retardée. Cependant, l'expression et l'organisation de la K 10, qui est un marqueur de différenciation précoce de l'épiderme, semble normale, et dans la peau in situ et dans la peau reconstruite. Puisque lors de la différenciation épidermique, la transcription des gènes codant pour la transcription des protéines précoces et tardives est régulée de façon indépendante, il est possible que le problème des cellules malades soit relié à des étapes plus avancées du processus de maturation de la peau. De plus, le processus de différenciation semble incomplet car on observe la présence de noyau dans les cellules de la couche cornée, chose qui n'est jamais observée dans les peaux normales. La synthèse des protéines de la peau suit un programme bien contrôlé, même chez les kératinocytes en culture primaire. Certaines protéines, comme le LDL-R par exemple, sont exprimées seulement ou plus fortement dans les cellules non différenciées (92). D'autres, comme la K10, ne sont exprimées que lorsque les cellules commencent le processus de différenciation. Certains facteurs de transcription comme les PPARs qui jouent un rôle important dans la régulation du métabolisme des lipides, varient leur niveau d'expression selon le stade de maturation des cellules. Il existe 3 types de PPARs. PPAR $\beta$  est le sous type prédominant dans les kératinocytes humains et son niveau d'expression ne varie pas, tandis que PPAR $\alpha$  est exprimé à des niveaux beaucoup plus bas et augmente de manière significative lors de la différenciation des kératinocytes (93).

Les résultats de RT-PCR confirment que chez les patientes atteintes de l'ichtyose huileuse, il y a bien un problème de différenciation. La plupart des protéines étudiées, le LDL-R, l'apoE, l'apoC1, le PPAR $\beta$  et la CGI-58 suivent un patron d'expression très semblable à celui retrouvé dans les cellules normales. À l'opposé, l'expression de PPAR $\alpha$  est anormale ; cette protéine qui normalement augmente avec la différenciation demeure très basse dans les cellules des patientes. Comme le PPAR $\alpha$  est nécessaire pour la synthèse de plusieurs enzymes impliqués dans le métabolisme des lipides de la peau, on

peut penser que sa sous-expression pourrait expliquer en partie le phénotype observé. La raison de cette sous-expression n'a pas été élucidée ; plusieurs facteurs contrôlent l'expression des PPARs et chacun devra faire l'objet d'une étude plus poussée.

La présence de lésions à la base des poils, des larmes huileuses et de l'hypertrophie des glandes sébacées suggère un problème au niveau des glandes sébacées. Le bilan lipidique suggère une dyslipidémie avec un profil de lipoprotéines et de lipides pratiquement identique pour les deux patientes, avec des niveaux bas de cholestérol, LDL, apoB et rétinol. Les triglycérides sont aussi très bas.

Les résultats des analyses histologiques ont révélé la présence de vésicules lipidiques dans les couches suprabasales des peaux reconstruites tandis que dans la peau normale, on observe plutôt des lamelles lipidiques au niveau de la couche cornée. Ces résultats suggèrent une anomalie de l'expression et la maturation des lipides qui servent à former la barrière hydrosoluble et pourraient expliquer le caractère huileux de l'épiderme.

Il existe plusieurs maladies génétiques de la peau avec des défauts connus dans le métabolisme des lipides et dont l'image clinique se manifeste par une peau écailleuse ou ichtyosique. Pour la majorité de ces maladies, même lorsque le défaut génétique est connu, le mécanisme précis par lequel la structure et la fonction du *stratum corneum* sont changées n'a pas été déterminé (94,95).

La synthèse des lipides de la barrière épidermique a été étudiée *in vivo* chez les souris chauves, pendant le développement foetal et dans une variété de modèles de kératinocytes en culture (96). Les études métaboliques *in vivo* ont démontré que les lipides de la barrière cutanée sont en grande partie synthétisés *de novo* à partir de l'acétate (97).

Le sébum humain contient du squalène, du cholestérol, des esters de cholestérol, des esters de cire, et des triglycérides. Pendant le passage du sébum par le follicule du cheveu, les enzymes bactériennes hydrolysent certains des triglycérides, de sorte que le mélange de lipides atteignant la surface de la peau contient des acides gras libres et des petites proportions de mono- et de diglycérides en plus des composants originaux (98).

Les esters de cire et le squalène distinguent le sébum des lipides des organes internes humains (99), qui ne contiennent aucun ester de cire et peu de squalène. Le squalène qui est synthétisé dans d'autres tissus est rapidement converti en lanostérol et par la suite en cholestérol (100). Les esters de cire représentent environ 25% des lipides du sébum. Ils ne sont pas synthétisés par d'autres cellules dans le corps. Ces lipides sont perturbés chez les patientes; il y a une diminution de la quantité de triglycérides et une augmentation de la quantité des acides gras. Cela suggère un défaut associé à la dernière étape de la synthèse des lipides cutanés. La séquence de la SCD-1 n'a toutefois révélé aucune mutation. Alors, la surexpression de l'ARNm de la SCD-1 et l'augmentation de son activité enzymatique n'explique pas les niveaux diminués de triglycérides et l'augmentation des acides gras dans la peau des patientes.

Puisque les glandes sébacées sont la deuxième source de lipides dans la peau, il est possible que ces dernières soit en fait responsables.

Dans des glandes sébacées humaines, le modèle prédominant est l'insertion d'une double liaison  $\Delta 6$  dans l'acide palmitique (16:0). L'acide sapiénique résultant (16:1 $\Delta 6$ ) est l'acide gras principal du sébum humain d'adulte (101).

Une double liaison  $\Delta 6$  peut être ajoutée seulement après que la liaison  $\Delta 9$  est en place. Cependant, l'élongation de la chaîne de deux carbones et l'insertion d'une autre double liaison entre le carbone 5 et 6 donnent l'acide sebaléique (18:2 $\Delta 5,8$ ), un acide gras qu'on pense être unique au sébum humain. La

désaturase  $\Delta 6$  (acide gras désaturase-2) est l'enzyme qui convertit le linoléate et l' $\alpha$ -linoléate en acides gras polyinsaturés à longue chaîne (106). Dans la peau humaine, le mRNA de la désaturase  $\Delta 6$  et l'expression de la protéine sont limités à la différenciation des glandes sébacées situées dans les couches suprabasales (102).

La production de sébum est continue et n'est pas commandée par les mécanismes neuraux. Récemment, des résultats dans les modèles transgéniques et de souris mutantes (103) ont fourni des indices sur l'identité des gènes présumément impliqués dans la production et la régulation du sébum. La majorité de ces souris mutantes sont caractérisées par des glandes sébacées hypoplasiques et par une production réduite de sébum, toutefois des études ont développé quelques souris transgéniques (104) qui ont des glandes sébacées hyperplasiques et une production accrue de sébum.

DGAT2 est un de ces gènes. Comme aucune mutation de ce gène n'a été retrouvée chez les patientes il faut regarder d'autres gènes candidats comme la  $\Delta 6$  désaturase ou encore la loricrin (LOR) et la *fatty aldehyde dehydrogenase* (FALDH) (105).

Il serait intéressant de regarder l'expression de cette enzyme et les niveaux d'acide sapiénique produits par les glandes sébacées de nos patientes.



## CONCLUSION

Ce travail a démontré que la maladie que nous avons étudiée était différente d'un Chanarin-Dorfman. En recherchant la source de cette maladie nous avons découvert des anomalies inédites, qu'il reste à relier plus avant à l'étiologie. Nous avons établi qu'il y a bien un déséquilibre entre la prolifération et la différenciation des cellules épidermiques et fait avancer la connaissance de cette nouvelle entité nosologique qui peut être défigurant et avoir des répercussions systémiques. De plus, l'étude des anomalies présentes dans ces cas aidera peut-être à mieux comprendre le métabolisme normal des lipides de la peau.

Un élément intéressant associé à cette étude est la possibilité de reproduire une maladie dans un modèle de culture. En effet, autant in situ que dans les peaux reconstruites, on observe un mosaïcisme, c'est-à-dire qu'il y a des variations régionales de l'aspect de l'épiderme. In situ, les zones atteintes montrent une perte d'intégrité de la couche cornée accompagnée d'une destruction de l'architecture des couches sous-jacentes. Même si dans les peaux reconstruites, l'épiderme des domaines de prolifération très épais ne présente pas une désorganisation aussi évidente, les couches de l'épidermes sont anormales. L'absence de la perte d'intégrité de la couche cornée peut être attribuable au fait qu'en culture, les peaux reconstruites ne sont soumises à aucun stress mécanique.

De plus, autant in situ qu'in vitro, la filaggrine semble apparaître plus tardivement au cours du processus de différenciation ce qui suggère que si le phénotype de la maladie est relié à une maturation retardée de l'épiderme, il peut être reproduit en culture. Ce modèle de culture pourrait donc être mis à profit pour étudier, par exemple, l'effet de certains agents thérapeutiques et apporter des réponses intéressantes à la poursuite des investigations sur les

facteurs étiologiques de la maladie, en plus de permettre la mise au point d'un traitement efficace.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Breathnach, A., and Bannister, L. H. Integumental system: skin and breasts. In Gray's anatomy (Williams, P. L., ed) Churchill-Livingstone, New-York, 1995, 376-412
2. Odland, G. F. Histology and fine structure of the epidermis. In The skin by 30 authors (Helwig, E. B., and Mostofi, F. K., eds) 1971, 10: 28-46
3. Holbrook, K. A., and Wolff, K. The structure and development of skin. In Dermatology in General Medecine (Fitzpatrick, T. B., Eisen, A. Z., Wolff, K., Freedberg, I. M., and Austen, K. F., eds) McGraw-Hill, New-York, 1987,21: 93-131
4. Holbrook, K. A., and Hennings, H. Phenotypic expression of epidermal cells in vitro: a review. J. Invest. Dermatol. 1983, 81: 11-24
5. Sahuc, F., Nakazawa, K., Berthod, F., Collombel, C., Damour, O. Mesenchymal-epithelial interactions regulate gene expression of type VII collagen and kalinin in keratinocytes and dermal-epidermal junction formation in a skin equivalent model. Wound Repair Regen. 1996; 155(5):469-473
6. Smola, H., Stark, H.-J., Thiekötter, G., Mirancea, N., Krieg, T., and Fusenig, N. E. Dynamics of basement membrane formation by keratinocyte-fibroblast interactions in organotypic skin culture. Exp. Cell Res.1998, 239: 399-410

7. Coulombe, P. A., Bousquet, O., Ma, L., Yamada, S., and Wirtz, D. The 'ins' and 'outs' of intermediate filament organization. *Trends Cell. Biol.* 2000, 10: 420-428
8. Régnier, M., Caron, D., Reichert, U., and Schaefer, H. Reconstructed human epidermis: a model to study in vitro the barrier function of the skin. *Skin Pharmacol.* 1991, 5: 49-56
9. Fitzpatrick, T. B., Eisen, A. Z., Wolff, K., Freedberg, I. M., and Austen, K. F., McGraw-Hill, New-York ,1994, 93-131
10. Parenteau, N. L., Nolte, C. M., Bilbo, P., Rosenberg, M., Wilkins, L. M., Johnson, E. W., Watson, S., Mason, V. S., and Bell, E. Epidermis generated in vitro: practical considerations and applications. *J. Cell. Biochem.* 1991, 45: 245-251
11. Eckert, R. L. Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. *Physiol. Rev.* 1989, 69: 1316-1346
12. Matoltsy, A. G., and Matoltsy, M. A study of morphological and chemical properties of keratohyalin granules. *J. Invest. Dermatol.* 1982, 38 : 237-247.
13. Schaefer, H. La couche cornée. In *Biologie de la peau*, 2ième cours francophone annuel (Thivolet, J., and Schmitt, D., eds) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris, 1985, 131 : 15-22
14. Lindsay, D. T. The integument. In *Functional human anatomy* (Smith, J. M., ed) Mosby-Year Book, St-Louis, 1996, 345-375

15. Fuchs, E. Epidermal differentiation and keratin gene expression. *J. Cell Sci.* 1993, Suppl 17: 197-208
16. Haake, A. R., and Polakowska, R. R. Cell death by apoptosis in epidermal biology. *J. Invest. Dermatol.* 1993, 101: 107-112
17. Gandarillas, A., Goldsmith, L. A., Gschmeissner, S., Leigh, I. M., and Watt, F. M. Evidence that apoptosis and terminal differentiation of epidermal keratinocytes are distinct processes. *Exp. Dermatol.* 1999, 8: 71-79
18. Hale, A. J., Smith, C. A., Sutherland, L. C., Stoneman, V. E. A., Longthorne, V. L., Culhane, A. C., and Williams, G. T. Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur. J. Biochem.* 1996, 236: 1-26
19. McConkey, D. J., and Orrenius, S. The role of calcium in the regulation of apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* 1996, 59: 775-783
20. Banks-Schlegel, S., and Green, H. Involucrin synthesis and tissue assembly by keratinocytes in natural and cultured human epithelia. *J. Cell Biol.* 1981, 90: 732-737
21. Coulombe, P. A. The cellular and molecular biology of keratins: beginning a new era. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1993, 5 : 17-29
22. Heenen, M. Cycle cellulaire. Cinétique des kératinocytes normaux. In *Biologie de la peau, 4ième cours francophone annuel* (Thivolet, J., and Schmitt, D., eds) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris, 1987, 161 : 19-28

23. Luca Borradori, Arnoud Sonnenberg. Structure and Function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J of Inv. of Derm.* April 1999, 112:112-140
24. Fuchs, E. Epidermal differentiation: the bare essentials. *J. Cell Biol.* 1990, 111: 2807-2814
25. Mehrel, T., Hohl, D., Rothnagel, J. A., Longley, M. A., Bundman, D., Cheng, C., Lichti, U., Bisher, M. E., Steven, A. C., Steinert, P. M., Yuspa, S. H., and Roop, D. M. Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. *Cell*, 1990, 61: 1103-1112
26. Madison KC. Barrier function of the skin: «La raison d'être» of the epidermis. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 231-41
27. Vahlquist A Ichthyosis-an inborn dryness of the skin, in *Dry skin and Moisturizers*, Hl. Maibach and M. Lodén Editors. Boca Raton: CRC Press, 2002; 76: 121-34
28. Takahashi M, IkezawaZ. Dry skin in atopic dermatitis and patients on hemodialysis, In *dry skin and moisturizers*, Hl. Maibach and M. Lodén Editors. Boca Raton: CRC Press, 2002;23: 135-46
29. Proksch E. Antilipemic drug-induced skin manifestations. *Hautarzt* 1995; 46 : 76-80
30. Ross, M. H., Romrell, L. J., and Kaye, G. I. Integumentary system. In *Histology, a text and atlas* (Coryell, P. A., ed) Williams & Wilkins, Baltimore, 1995, 153: 370-403

31. Watt, F. M. Terminal differentiation of epidermal keratinocytes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1989, 1: 1107-1115
32. Rawlings, A. V., Scott, I. R., Harding, C. R., and Bowser, P. A. Stratum corneum moisturization at the molecular level. *J. Invest. Dermatol.* 1994, 103: 731-740
33. Grubauer, G., Feingold, K. R., Harris, R. M., and Elias, P. M. Lipid content and lipid type as determinants of the epidermal permeability barrier. *J. Lipid Res.* 1989, 30: 89-96
34. Saint-Léger D : Les lipides cutanés de surface chez l'homme. Bilan et perspectives des recherches. *Ann. Dermatol. Venereol.* 1982; 98(7) : 39-45
35. Elias, P. M. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J. Invest. Dermatol.* 1983, 80: 44-49
36. Bouwstra, J. A., G. S. Gooris, F. E. R. Dubbelaar, A. M. Weerheim, and M. Ponc. pH, cholesterol sulfate, and fatty acids affect the stratum corneum lipid organization. *J. Invest. Dermatol.* 1998. 109 : 348-355
37. Meynadier J. Glandes sébacées. *Précis de Physiologie cutanée* sous la direction de J. Meynadier. La porte Verte, Paris, 1980, 79:12-16
38. Tidman, M. J., and Eady, R. A. J. Ultrastructural morphometry of normal human dermal-epidermal junction. The influence of age, sex, and body region on laminar and nonlaminar components. *J. Invest. Dermatol.* 1984, 83: 448-453

39. Ponc, M., Weerheim, A., Kempenaar, J., Mulder, A., Gooris, G. S., Bouwstra, J., and Mommaas, A. M. The formation of competent barrier lipids in reconstructed human epidermis requires the presence of vitamin C. *J. Invest. Dermatol.* 1997, 109: 348-355
40. Moore, D. J., and M. E. Rerek. Insights into the molecular organisation of lipids in the skin barrier from infrared spectroscopy studies of stratum corneum lipid models. *Acta Derm. Venereol. Suppl*, 2000, 211: 1052-1054
41. Ponc, M. Reconstruction of human epidermis on de-epidermized dermis: expression of differentiation-specific protein markers and lipid composition. *Toxic. In Vitro*, 1991, 5: 597-606
42. Lampe, M. A., Williams, M. L., and Elias, P. M. Human epidermal lipids: characterization and modulations during differentiation. *J. Lipid Res.* 1983, 24: 131-140
43. Nikkari T, PH Schreiberman, EH Ahrens. In vivo studies of sterol and squalene secretion by human skin. *J of lipid research*, 1974, 15:789-793
44. Pochi PE, Strauss JS, Downing DT. Age-related changes in sebaceous gland activity. *J Invest Dermatol.* 1979,101: 107-112
45. Imokawa G, Hattori MA. A possible function of structural lipids in the water-holding properties of the stratum corneum. *J Invest Dermatol* 1985, 121: 467-479
46. Imokawa G, Akasaki S, Kawamata A, Yanao S, Takaishi N.. Water-retaining function in the stratum corneum and its recovery properties by synthetic pseudo-ceramides. *J Soc Cosmet Chem*,1989, 67:132-145



47. John J. DiGiovanna and Leslie Robinson-Bostom Ichthyosis. Etiology, diagnosis, and Management. *Am J Clin Dermatol* 2003, 131: 945-948
48. Anders Vahlquist, Agneta Ganemo, Maritta Pigg, Marie Virtanen and Per Westermark. The clinical spectrum of congenital Ichthyosis in Sweden : A review of 127 cases. *Acta Derm Venerol* 2003, 213:34-47
49. Gabriele Richard. Molecular genetics of the ichthyoses. *American J of Medical genetics Part C*.1995, 131:32-44
50. Piraud M, Maire I, Zlot M. X-linked recessive ichthyosis. Enzymatic diagnosis of affected male and female carriers. *Enzyme*, 1989, 41: 227-234
51. Traupe H, Happle R. Alopecia ichthyotica. A characteristic feature of congenital ichthyosis. *Dermatologica*, 1983, 167:225-230
52. Mallory SB, Kletzel M, Turley CP. X-linked ichthyosis with acute lymphoblastic leukemia. *Arch Dermatol*, 1988, 124:22-24
53. Laiho E, Niemi KM, Ignatius J, Kere J. Clinical and morphological correlations for transglutaminase 1 gene mutations in autosomal recessive congenital ichthyosis. *Eur J Hum Genet* 1999, 7:625-632
54. Pigg M, Gedde-Dahl T, Jr, Cox D. Strong founder effect for transglutaminase 1 gene mutation in lamellar ichthyosis and congenital ichthyosiform erythroderma from Norway. *Eur J Hum Genet*. 1998, 6:589-596
55. Dorfman ML, Hershko C, Eisenberg S. Ichthyosiform dermatosis with systemic lipidosis. *Arch Dermatol* 1994, 110:261-266

56. Piccirillo A, Auricchio L, Fabbrocini G, Parenti G. Ocular findings and skin histology in a group of patients with X-linked ichthyosis. *Br J Dermatol* 1988, 119:185-188
57. Hubber M, Yee VC, Burri N, Hohl D. Consequences of seven novel mutations on the expression and structure of keratinocyte transglutaminase. *J Biol Chem* 1997, 272:21018-21026
58. Hofman B, Stege H, Ruzicka T, Lehmann P. Effect of topical tazarotène in the treatment of congenital ichthyoses. *Br J Dermatol* 1999 ; 141 ; 4 : 642-6
59. Chanarin I et al. Neutral-lipid storage disease: a new disorder for lipid metabolism. *Br Med J*, 1975, 42: 553-5
60. Lefevre C, Audebert S, Jobard F, Caux F, Bouadjar B, Heilig R, Lakhdar H. Mutation in the transporter ABCA12 are associated with lamellar ichthyosis type 2. *Hum Mol Genet*, 2003, 12:2369-2378
61. MasashiA et all. Truncation of CGI-58 Protein causes malformation of lamellar granules resulting in ichthyosis in dorfman-Chanarin syndrome. *The Journal of Inv. Dermatoloy*, 2003, 234:117-132
62. Germain, L., Rouabhia, M., Guignard, R., Carrier, L., Bouvard, V., and Auger, F. A. (1993) Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin. *Burns* 19: 99-104
63. Poumay Y, Dupont F, Marcoux S, Leclercq-Smekens M, Herin M, Coquette A. A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in vitro studies. *Arch Dermatol Res.* 2004 Oct; 296(5):203-11

64. Terskikh VV, Vasil'ev AV. Epidermal stem cells. *Izv Akad Nauk Ser Biol.* 2001 Nov-Dec ;( 6):738-44
65. Bernot KM, Coulombe PA, Wong P. Skin: an ideal model system to study keratin genes and proteins. *Methods Cell Biol.* 2004; 78:453-87
66. Andreadis St, Hamone Ke, Yarmush ML, Morgan JR. Keratinocyte growth factor induces hyperproliferation and delays differentiation in a skin equivalent model system. *FASEB J.* 2001; 15(6):898-906
67. Wood LC, Jackson SM, Elias PM, Grunfeld C, Feingold KR. Cutaneous barrier perturbation stimulates cytokine production in the epidermis of mice. *J Lipid Research* 1992, 33 :1307-1314
68. Sharon Grehan, Charles Allan, Elizabeth Tse, David Walker and John M. Taylor. Expression of the apolipoprotein E gene in the skin is controlled by a unique downstream enhancer. *J Invest. Dermatology.* Jan. 2001, 116, no.1
69. Gautier T, Masson D, Jong MC, Duverneuil L, Le Guern N, Deckert V, Pais de Barros JP, Dumont L, Bataille A, Zak Z, Jiang XC, Tall AR, Havekes LM, Lagrost L. Apolipoprotein CI deficiency markedly augments plasma lipoprotein changes mediated by human cholesteryl ester transfer protein (CETP) in CETP transgenic/ApoCI-knocked out mice. *J Biol Chem.* 2002 Aug 30; 277(35):31354-63
70. Caux F, Selma ZB, Laroche L, Prud'homme JF, Fischer J. CGI-58/ABHD5 gene is mutated in Dorfman-Chanarin syndrome. *Am J Med Genet A.* 2004 Aug 30; 129(2):214

71. Komuves LG, Hanley K, Lefebvre AM, Man MQ, Ng DC, Bikle DD, Williams ML, Elias PM, Auwerx J, Feingold KR. Stimulation of PPAR $\alpha$  promotes epidermal keratinocyte differentiation in vivo. *J Invest Dermatol*. 2000 Sep; 115(3):353-60
72. Williams ML, Elias PM. Genetically transmitted, generalized disorders of cornification: the ichthyoses. *Dermatol Clin* 1987, 5 (1): 155-78
73. Laiho E, Ignatius J, Mikkola H, et al. Transglutaminase 1 mutations in autosomal recessive congenital ichthyosis: private and recurrent mutations in an isolated population. *Am J Hum Genet* 1997, 61; (3): 529-38
74. Mary L Williams, Thomas K. Koch, James J. O'Donnell. Ichthyosis and neutral lipid storage disease. *Am J Med Genet*, 1985, 20:711-726
75. Herron BJ, Bryda EC, Heverly SA, Collins DN, Flaherty L. Scraggly, a new hair loss mutation on mouse chromosome 19. *Mamm Genome*. 1999 Sep; 10(9):864-9
76. Makoto Miyazaki, Weng Chi man and James M Ntambi. Targeted Disruption of stearoyl-CoA desaturase 1 gene in mice causes atrophy of sebaceous and Meibomian glands and depletion of wax esters in the eyelid. *Am Society for Nutritional Sciences* 2001,59: 2260-2268
77. Alan D. Attie et al. Relationship between stearoyl-CoA Desaturase activity and plasma triglycerides in human and mouse hypertriglyceridemia. *J of Lipid Research*, 2002, 43: 1899-1907

78. Ntambi JM, Miyazaki M, Dobrzyn A. Regulation of stearoyl-CoA desaturase expression. *Progress in Lipid Research* 2004, 43: 91-104
79. Koji Wakimoto, Hiroaki Chiba, Hideo Michibata, Mariko Seishima. A novel diacylglycerol acyltransferase (DGAT2) is decreased in human psoriatic skin and increased in diabetic mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 310: 296-302
80. Scot J Stones et al. Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice. *The J of Biol. Chemistry*, 2004, 279(12):11767-11776
81. Kimberly k. Buhman, Hubert C. Chen, Robert V. Farese. The enzymes of neutral lipids synthesis. *The J of Bio. Chemistry*, 2001, 276(44):40369-40372
82. Fraser T., Waters A. Does triacylglycerol biosynthesis require diacylglycerol acyltransferase? *Biochemical Society Transactions*, 2000, 28, part 6
83. Sylvaine Cases et al. Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members. *The J of Biol. Ch.*, 2001,276(42):38870-38876
84. R.M. Bell, LM. Ballas, RA Coleman. Lipid topogenesis. *J Lipid Res.* 2000, 22: 391-403
85. Diane Thiboutot, Aruntha Sivarajah, Kathryn Gilliland, Zhaoyuan Cong. The melanocortin 5 receptor is expressed in human sebaceous glands and rat preputial cells. *J of Invest Dermatol.* 2000, 115: 614-619

86. Nanda A, Sharma R, Kanwar AJ et al. Dorfman-Chanarin syndrom. *Int J Dermatol*, 1990; 29 : 349-511
87. Judge MR, Atherton DJ, Salvayre R et al. Neutral lipid storage disease. Case report and lipid studies. *Br J Dermatol*, 1994, 130: 507-10
88. Lai et al. Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *caenorhabditis elegans* by comparative proteomics. *Genome Res* 2000; 5 : 703-13
89. Lefevre C, Jobard F, Caux F, Bouadjar B, Karaduman A, Heilig R, Lakhdar H. Mutation in CGI-58, the gene encoding a new protein of the esterase/lipase/thioesterase subfamily, in Chanarin-Dorfman syndrome. *Am J Hum Genet* 2001. 69:1002-1012
90. Labbe O, Desarnaud F, Eggerickx D. Molecular cloning of a mouse melanocortin 5 receptor gene widely expressed in peripheral tissues. *Biochemistry* 1994, 33: 4543-4549
91. Nowell NW, Thody AJ, and Woodley R.  $\alpha$ -melanocyte –stimulating hormone and aggressive behavior in the male mouse. *Physiol. Behav.*, 1990, 24:5-8
92. Régnier, M., Pruniéras, M., and Woodley, D. Growth and differentiation of adult human epidermal cells on dermal substrates. *Front. Matrix Biol.* 1981, 9: 4-35
93. Rosenfield RL, Deplewski D, Greene ME. Peroxisome proliferator-activated receptors and skin development. *Horm Res.* 2000; 54(5-6): 269-74

94. Tidman, M. J., and Eady, R. A. J. Ultrastructural morphometry of normal human dermal-epidermal junction. The influence of age, sex, and body region on laminar and nonlaminar components. *J. Invest. Dermatol.* 1984, 83: 448-453
95. Eady, R. A. J. The basement membrane. Interface between the epithelium and the dermis: Structural Features. *Arch. Dermatol.* 1988, 124:709-712
96. Reichelt J, Breiden B, Sandhoff K, Magin TM Loss of keratin 10 is accompanied by increased sebocyte proliferation and differentiation. *Eur J Cell Biol.* 2004;83(11-12):747-59
97. Claudy A. Cutaneous lipids: from physiology to the clinical. *Pathol. Biol* 2003, 51 (5):260-3
98. Choi MJ, Maibach HI. Role of ceramides in barrier function of healthy and diseased skin. *Am J Clin Dermatol.* 2005, 22:3459-3489
99. Lipoproteins in relation to skin disease. *British J of Dermatol.* 1973, 88: 191
100. Andrea Ballabio, Larry J Shapiro. Ichthyosis and lipid metabolism. 1970, Chapter 96:3011-3012
101. Nakamura MT, NaraTY. Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2003 Feb; 68(2):145-50
102. Ge L, Gordon JS, Hsuan C, Stenn K, Prouty SM. Identification of the delta-6 desaturase of human sebaceous glands : expression and enzyme activity. *J Invest Dermatol.* 2003 May;120(5):707-14.

103. Miek C. Jong, Marion J.J. Gijbels, Vivian. Hyperlipidemia and cutaneous abnormalities in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein C1. *J Clin. Invest.* January 1998, 101(1): 145-152
104. Stenn KS. Insights from the asebia mouse: a molecular sebaceous gland defect leading to cicatricial alopecia. *J Cutan Pathol.* 2001 Oct; 28(9):445-7.
105. Michel Rivier et al. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor subtype during the differentiation of human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* December 1998, 3(6):8
106. Tang C, Cho HP, Nakamura MT, Clarke SD. Regulation of human delta-6 desaturase gene transcription: identification of a functional direct repeat-1 element. *J Lipid Res.* 2003; 44(4):686-95
107. Klein-Szanto, A. J. P. Stereologic baseline data of normal human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 1977, 68: 73-78
108. Brody, I. The ultrastructure of the tonofibrils in the keratinization process of normal human epidermis. *J. Ultrastruct. Res.* 1960, 4: 264-297
109. Dale, B. A., Resing, K. A., and Presland, R. B. Keratohyalin granule proteins. In *The Keratinocyte Handbook* (Leigh, I., Lane, B., and Watt, F., eds) pp. 323-350, Cambridge University Press, Cambridge ) A study of morphological and chemical properties of keratohyalin granules. *J. Invest. Dermatol.* 1994, 38: 237-247
110. Steven, A. C., Bisher, M. E., Roop, D. R., and Steinert, P. M. Biosynthetic pathways of filaggrin and loricrin - two major proteins



- expressed by terminally differentiated epidermal keratinocytes. *J. Struct. Biol.* 1990, 104:150-162
111. Matoltsy, A. G. Desmosomes, filaments, and keratohyaline granules: their role in the stabilization and keratinization of the epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 1975, 65:127-142
  112. Watt, F. M., and Phil, D. Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation. *J. Invest. Dermatol.* 1983, 81:100-103
  113. DiPersio, C. M., van Der Neut, R., Georges-Labouesse, E., Kreidberg, J. A., Sonnenberg, A., and Hynes, R. O.  $\alpha 3\beta 1$  and  $\alpha 6\beta 4$  integrin receptors for laminin-5 are not essential for epidermal morphogenesis and homeostasis during skin development. *J. Cell Sci.* 2000, 113:3051-3062
  114. Briggaman, R. A., and Wheeler, C. E. The epidermal-dermal junction. *J. Invest. Dermatol.* 1975, 65:71-84
  115. Kazama, T., Yaoita, E., Ito, M., and Sato, Y. Charge-selective permeability of dermo-epidermal junction: tracer studies with cationic and anionic ferritins. *J. Invest. Dermatol.* 1988, 91 :560-565
  116. Garrone, R. Le fibroblaste et la biosynthèse du collagène. In *Biologie de la peau, 2ième cours francophone annuel* (Thivolet, J., and Schmitt, D., eds) Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris, 1985, 131 :81-84
  117. Franke, W. W., Grund, C., Kuhn, C., Lehto, V. P., and Virtanen, I. Transient change of organization of vimentin filaments during mitosis as demonstrated by a monoclonal antibody. *Exp. Cell Res.* 1984, 154 :567-580

118. Tortora, G. J., and Anagnostakos, N. P. L'appareil tégumentaire. In Principes d'anatomie et de physiologie 1988,7 :106-121, Cente Éducatif et Culturel, Montréal
119. Hould, R. Le tégument. In Histologie descriptive et éléments d'histopathologie 1982, 9 :237-247, Décarie, Montréal
120. Schön, M., Benwood, J., O'Connell-Willstaedt, T., and Rheinwald, J. G. Human sweat gland myoepithelial cells express a unique set of cytokeratins and reveal the potential for alternative epithelial and mesenchymal differentiation states in culture. J. Cell Sci. 1999, 112: 1925-1936
121. Grinnell, F. Wound repair, keratinocyte activation and integrin modulation. J. Cell Sci. 1992, 101:1-5
122. Pena-Penabad C, Almagro M, Martinez W, Garcia-Silva J, Del Pozo J, yebra MT. Dorfman-Chanarin syndrome (neutral lipid storage disease): new clinical features. British J of Dermatol. 2001, 144: 415-448

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur, le docteur Jean Davignon, pour m'avoir fait confiance et m'avoir accueillie dans son laboratoire, et pour m'avoir guidée et encouragée pendant ces deux années de travail tout en me laissant une grande liberté et en me déléguant plusieurs responsabilités dont j'espère avoir été à la hauteur.

Mes remerciements vont également au docteur Lise Bernier, pour tous ses conseils judicieux, son professionnalisme et aussi pour la gentillesse et la patience qu'elle a manifestées à mon égard durant la rédaction de ce mémoire. Elle a également contribué par ses nombreuses remarques et suggestions à améliorer la qualité de ce mémoire. Pour tout cela, je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance.

Je remercie de plus l'équipe du Groupe de Recherches sur les Hyperlipidémies et l'Athérosclérose de l'IRCM. Mes remerciements vont aussi aux collègues qui m'ont aidée à un moment ou à un autre : Geneviève, Jean-François, Hanny. Je garderai un précieux souvenir de vous tous!

Pour le support moral, la palme revient à Lucie Boulet qui a toujours eu un bon mot pour m'encourager. Merci Lucie!

Mes sincères remerciements à mes parents qui, par leur amour, ont toujours cru en moi et m'ont encouragée dans mes choix. Merci, sans vous je ne serais pas "maître" aujourd'hui.

Un merci spécial à Mihai, mon copain, qui a "survécu" à toutes mes périodes de stress et qui m'a soutenue dans tous mes moments de gloire ou de fatigue. Merci pour ta présence et tes encouragements.